

SÉRIE A, N° 738

N° D'ORDRE :

1508

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. L.-C. MAILLARD

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

1^{re} THÈSE. — ACTION DE LA GLYCÉRINE ET DES SUCRES SUR LES ACIDES
 α -AMINÉS : CYCLO-GLYCYL-GLYCINES ET POLYPEPTIDES ;
MÉLANOÏDINES ET MATIÈRES HUMIQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 7 Juin 1913, devant la Commission d'Examen.

MM. HALLER	<i>Président.</i>
BLAISE	} <i>Examineurs.</i>
GUILLET	
PORTIER	

LAVAL

L. BARNEOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

1913

SÉRIE A, N° 738
N° D'ORDRE :
1508

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

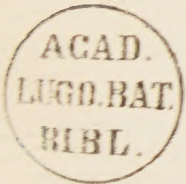
PAR

M. L.-C. MAILLARD

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

- 1^{re} THÈSE.** — ACTION DE LA GLYCÉRINE ET DES SUCRES SUR LES ACIDES
α-AMINÉS : CYCLO-GLYCYL-GLYCINES ET POLYPEPTIDES ;
MÉLANOÏDINES ET MATIÈRES HUMIQUES.
- 2^e THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **Juin 1913**, devant la Commission d'Examen.



MM. HALLER *Président.*
BLAISE
GUILLET } *Examineurs.*
PORTIER }

LAVAL

L. BARNÉOUD & C^{ie}, IMPRIMEURS

1913

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM

Doyen..... P. APPELL, *Profess.* Mécanique analytique et mécan. céleste

Doyen honoraire G. DARBOUX. — Géométrie supérieure

Profess. honoraires. { Ch WOLF
J. RIBAN.

<i>Professeurs</i>	LIPPMANN	Physique
	BOUTY.....	Physique.
	BOUSSINESQ	Phys.mathém. et calcul des probabilités.
	PICARD	Analyse supér. et algèbre supérieure
	Y. DELAGE	Zoologie, anatomie, physiologie compar.
	G. BONNIER	Botanique.
	DASTRE	Physiologie
	KOENIGS.....	Mécanique physique et expérimentale.
	VELAIN.....	Géographie physique.
	GOURSAT.....	Calcul différentiel et calcul intégral.
	HALLER.....	Chimie organique.
	JOANNIS.....	Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET.....	Physique —
	WALLERANT.....	Minéralogie.
	ANDOYER.....	Astronomie.
	PAINLEVÉ.....	Mécanique rationnelle.
	HAUG	Géologie.
	HOUSSAY.....	Zoologie.
	H. LE CHATELIER.	Chimie.
	G. BERTRAND.. ..	Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE.....	Physique générale.
	CAULLERY	Zoologie (Évolution des êtres organisés)
	C. CHABRIÉ.....	Chimie appliquée.
	G. URBAIN.....	Chimie
	EMILE BOREL	Théorie des fonctions.
	MARCHIS	Aviation.
	JEAN PERRIN.....	Chimie physique.
	G. PRUVOT.....	Zoologie, anatomie, physiol. comparée
	ABRAHAM	Physique.
	MATRUCHOT.....	Botanique.
	CARTAN	Calcul différentiel et calcul intégral.
	Cl. GUICHARD.....	Mathématiques générales.
N.....	Application de l'analyse à la géométrie.	
N.....	Histologie.	

<i>Professeurs-adjoints.</i>	PUISEUX	Mécanique et Astronomie.
	LEDUC.....	Physique.
	MICHEL	Minéralogie.
	HEROUARD.....	Zoologie.
	LÉON BERTRAND..	Géologie.
	RÉMY PERRIER.....	Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	MOLLIARD.....	Physiologie végétale.
	COTTON	Physique.
	LESPIEAU	Chimie.
	GENTIL.....	Pétrographie.
	SAGNAC.....	Physique (Enseignement P. C. N.).
	PEREZ	Zoologie Evolution des êtres organisés

Secrétaire D. TOMBECK

A MON ÉMINENT MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

M. le Professeur A. HALLER

MEMBRE DE L'INSTITUT

COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MON CHER ET VÉNÉRÉ MAÎTRE

M. le Professeur ARMAND GAUTHIER

MEMBRE DE L'INSTITUT

COMMANDEUR DE LA LÉGION D'HONNEUR



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

Parmi les innombrables sujets de recherches qui s'offrent à l'activité du travailleur dans le domaine de la Chimie organique, les uns comportent la préparation de substances inédites enrichissant d'individus nouveaux des séries déjà connues, ou même en inaugurant de nouvelles ; d'autres consistent plutôt à rechercher des méthodes et des mécanismes, à préciser les conditions de réaction qui permettent la transformation mutuelle de substances déjà connues par ailleurs.

C'est à ce dernier ordre de recherches qu'appartient le présent travail, orienté comme ma carrière scientifique elle-même vers l'interprétation physico-chimique des phénomènes de la vie : ce travail est avant tout une contribution à la synthèse des matières protéiques. Il consiste en une étude d'ordre purement chimique, mais dont j'ai choisi intentionnellement le sujet parmi ceux dont la connaissance chimique approfondie peut être d'un secours tout particulier pour la solution des grands problèmes de la Biologie.

En présentant ce travail, sous forme de thèse, à la Faculté des Sciences de Paris, je suis heureux d'accomplir un très agréable devoir en exprimant ma profonde gratitude à tous ceux qui, dans toutes les branches, par leur exemple ou par leur enseignement, et depuis le début de la carrière, m'ont aidé

ou encouragé dans la voie de la recherche. J'en dois aujourd'hui l'hommage tout particulièrement à deux des personnalités scientifiques de notre pays.

M. le professeur A. HALLER a été pour moi, dans l'ordre chimique, à la fois le premier des maîtres et le plus bienveillant, depuis que j'eus l'honneur de suivre ses leçons magistrales à l'Institut chimique de Nancy, où il aimait à encourager de sa foi scientifique les vocations naissantes. Quand la renommée du savant et du chef d'école l'eut appelé à la Sorbonne et à l'Institut, sa bienveillance à l'égard de ses anciens élèves ne s'est jamais démentie, et il m'a été personnellement donné d'en recevoir à diverses reprises des marques précieuses. En me faisant aujourd'hui l'honneur d'accueillir ce travail comme thèse pour le Doctorat ès Sciences, mon éminent maître veut bien ajouter aux précédents un nouveau témoignage de sa sollicitude, et je le prie d'accepter l'hommage de ma respectueuse reconnaissance.

M. le professeur Armand GAUTIER m'a fait le grand honneur de me désigner comme Chef des travaux de son Laboratoire de recherches, à une époque où ma vocation scientifique avait besoin d'une consécration officielle et des ressources de travail qu'offrent aux chercheurs les grands laboratoires de l'Université. Grâce à l'affectueuse bonté de ce maître éminent, j'ai pu vivre dix années qui compteront parmi les meilleures, à l'ombre de cette chaire glorieuse où sa personnalité puissante savait ajouter encore à l'éclat du flambeau que lui avaient transmis les Würtz et les J.-B. Dumas. Je suis heureux d'offrir aujourd'hui à M. Armand GAUTIER le nouvel hommage de ma très respectueuse et sincère affection, en même temps que de mon admiration pour une ardeur scientifique qui ne semble puiser dans le renouveau des printemps qu'un perpétuel regain de force et de fécondité.

Les recherches dont l'exposé va suivre ont exigé l'emploi d'un matériel très coûteux, non certes par sa rareté dans la nature où il est au contraire répandu à profusion, mais par les

manipulations interminables qu'impose la difficulté d'isolement et de purification de ses divers constituants. Le bienveillant appui de la Caisse des Recherches Scientifiques m'a été en l'occurrence fort précieux, et je tiens à exprimer mes meilleurs remerciements au Conseil d'administration de la Caisse et à sa Commission technique.

Les contrôles minutieux et parfois difficiles qu'il est indispensable de faire subir aux matériaux avant de les utiliser avec confiance, ont été tous exécutés, soit de mes propres mains, soit sous mes yeux et par les soins de M. E. MURLAY, à qui je tiens à rendre un hommage tout particulier. Ne sachant ici ce qu'il faut le plus louer, de la science et de la sagacité du manipulateur, de l'habileté et de la rigueur de l'analyste, ou de l'amical dévouement du collaborateur, j'offrirai à M. E. MURLAY l'expression de ma très affectueuse reconnaissance.

PREMIÈRE THÈSE

ACTION DE LA GLYCÉRINE ET DES SUCRES
SUR LES ACIDES α -AMINÉS

CYCLO-GLYCYL-GLYCINES ET POLYPEPTIDES
MÉLANOÏDINES ET MATIÈRES HUMIQUES

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

I. — Importance des acides aminés dans la constitution des albuminoïdes	2
II. — Essais de condensation directe des acides aminés en molécules albuminoïdes	13
III. — Condensation spontanée de dérivés des aminoacides : synthèse empirique de dérivés des polypeptides.	21
IV. — Condensation méthodique de dérivés des aminoacides : synthèse graduelle de dérivés des polypeptides.	32
V. — Synthèse des polypeptides libres	38
VI. — Recherche du mécanisme naturel de la synthèse protéique chez les êtres vivants	45
VII. — Nomenclature nouvelle des dipeptides cycliques : la série des cyclo-glycyl-glycines	46
VIII. — Divisions du travail	53

PREMIÈRE PARTIE

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LE GLYCOCOLLE

(Synthèse de la cyclo-glycyl-glycine et des chaînes polyglycylques paires)

Chapitre premier. — Action de la glycérine sur le glycolle.	57
Expériences de Balbiano et Trasciatti	57
Expériences personnelles	59

Origine et contrôle du glyocolle	60
Action de la glycérine sur le glyocolle à 170°	62
Prépondérance de la cyclo glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine)	64
Origine de la matière brune	66
Présence de l'anhydride « corné » polyglycylique : cyclo-poly-glycyl-glycine.	67
Formation transitoire d'une substance biurétique soluble : triglycyl-glycine	67
Formation secondaire d'une substance biurétique insoluble : penta-glycyl-glycine.	68
Recherche de la glycyl-glycine au début de la condensation.	70
Difficultés d'isolement et d'étude des produits de la réaction	72
Chapitre II. — Produits de condensation du glyocolle. Cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine)	77
Préparation de la cyclo-glycyl glycine (2.5 diacipipérazine)	77
Propriétés de la cyclo glycyl-glycine	81
Analyse centésimale	82
Aspect microscopique de la cyclo-glycyl-glycine	84
Combinaisons prétendues de la 2.5.diacipipérazine	85
Prétendu chloroplatinate de la 2.5.diacipipérazine.	86
Essai de préparation du chloroplatinate de cyclo-glycyl glycine	89
Identité du prétendu chloroplatinate de 2.5.diacipipérazine avec le chloroplatinate de glycyl-glycine	91
Chapitre III. — Produits de condensation du glyocolle. Recherche infructueuse de la glycyl-glycine	93
Intérêt de la recherche de la glycyl-glycine	93
Préparations de la glycyl-glycine	93
Propriétés de la glycyl-glycine	95
Analyse centésimale	96
Transformation spontanée de la glycyl-glycine en triglycyl-glycine	96
Recherche microscopique de la glycyl-glycine	99
Chloroplatinate de glycyl glycine	102
Recherche de la glycyl-glycine dans les premières phases de la condensation du glyocolle	108
Chapitre IV. — Produits de condensation du glyocolle. Tri-glycyl-glycine	111
Isolement de la triglycyl-glycine par fractionnement sans actions chimiques	111
Préparation de la triglycyl-glycine	114
Constitution de la substance biurétique	116
Analyse centésimale	117
Difficulté du dosage de l'azote par la méthode Dumas dans les chaînes polyglycyliques supérieures	119

Propriétés de la triglycyl-glycine	121
Comparaison de la triglycyl-glycine nouvellement préparée avec la triglycyl-glycine de E. Fischer	122
Transformation de la substance biurétique en chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle	124
Comparaison du chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle avec le chlorhydrate de la « base biurétique » de Th. Cartius	128
Chapitre V. — Produits de condensation du glyocolle. Pentaglycyl glycine.	131
Préparation de la pentaglycyl-glycine	131
Propriétés de la pentaglycyl-glycine	133
Analyse centésimale.	133
Constitution de la pentaglycyl-glycine.	134
Comparaison de la pentaglycyl-glycine nouvellement préparée avec la pentaglycyl-glycine de E. Fischer	135
Interprétations possibles de la formation de pentaglycyl-glycine	137
Chapitre VI. — Produits de condensation du glyocolle. Cyclo-polyglycyl-glycine.	141
Isolement de la cyclo-polyglycyl-glycine par simples lavages	141
Purification par dissolution à froid dans les acides minéraux concentrés	143
Isolement rapide par dissolution chlorhydrique.	143
Propriétés de la cyclo-polyglycyl-glycine.	144
Analyse centésimale	147
Constitution de la cyclo-polyglycyl-glycine	150
Chapitre VII. — Produits de condensation du glyocolle. Matière brune, matière alcaloïdique.	152
Propriétés de la matière brune	152
La matière brune, azotée, dérive de la cyclo-glycyl-glycine.	152
La matière brune ne se forme pas par oxydation	153
Réactions d'alcaloïde dans les solutions brunes.	155
Chapitre VIII. — Marche de la réaction peptidogène.	157
Disposition de l'expérience	157
Evaluation approximative de la matière colorante	160
Evaluation approximative de la substance biurétique (triglycyl-glycine).	162
Dosage du glyocolle libre.	166
Dosage total du glyocolle libre et anhydrisé	171
Dosage de l'azote total.	176
Recherche de la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine)	179
Recherche de la glycyl-glycine	180
Présence de la cyclo-polyglycyl-glycine (anhydride « corné »)	180
Synthèse des résultats.	181
Conclusions	183

Chapitre IX. — Influence de la proportion de glycérine . . .	186
Chapitre X. — Mécanisme probable de la synthèse des poly-peptides par la glycérine	193
Nouveauté des résultats du présent travail	193
Mécanisme probable de la synthèse peptidogène : l'éthérification glycérique	196
Chapitre XI. — Intérêt biologique de la nouvelle synthèse peptidogène	201
La nouvelle synthèse ne met en jeu que des substances biologiques	201
Le mécanisme de la nouvelle synthèse est comparable à celui des réactions biologiques	202
Théorie de la protéogénèse naturelle	205
Corollaire de la théorie. Nécessité de la glycérine (ou des graisses) pour l'utilisation digestive des protéiques alimentaires. . . .	206
Corollaire de la théorie. Superposition des figures cytologiques de l'absorption intestinale pour les graisses et les albuminoïdes . .	210

DEUXIÈME PARTIE

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LES HOMOLOGUES DU GLYCOCOLLE, ISOLÉS

(Synthèse des cyclo-glycyl-glycines homogènes)

Chapitre XII. — Action de la glycérine sur la sarcosine Synthèse de la cyclo-sarcosyl-sarcosine.	217
Préparation de la sarcosine	217
Contrôle de la sarcosine	219
Action de la glycérine sur la sarcosine	220
Produit fondamental de condensation de la sarcosine	222
Propriétés du produit de condensation. Cyclo-sarcosyl-sarcosine .	223
Analyse centésimale	224
Cryoscopie	225
Conclusions	225
Anhydrides de sarcosine de J. Traube et de F. Mylius.	226
Chapitre XIII. — Action de la glycérine sur la leucine. Synthèse de la cyclo-leucyl-leucine.	230
Documents historiques sur les leucinimides. Leucinimides naturelles.	231
Documents historiques sur les leucinimides. Leucinimides synthétiques	240
Isomérisie des cyclo-leucyl-leucines	247

Origine et contrôle de la leucine employée	253
Action de la glycérine sur la d.l.leucine	253
Produit fondamental de condensation de la d.l.leucine	258
Analyse centésimale	260
Point de fusion. Cyclo-leucyl-leucine racémique	260
Chapitre XIV. — Action de la glycérine sur l'alanine. Synthèse de la cyclo-alanyl-alanine	
Origine et contrôle de l'alanine	261
Action de la glycérine sur l'alanine à 170°	263
Produit fondamental de condensation de l'alanine. Cyclo-alanyl-alanine	265
Analyse centésimale	266
Isomérisation des cyclo-alanyl-alanines	266
Historique des cyclo-alanyl-alanines	267

TROISIÈME PARTIE

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LES HOMOLOGUES DU GLYCOCOLLE, EN MÉLANGE

(Synthèse des cyclo-glycyl-glycines mixtes)

Chapitre XV. — Action de la glycérine sur le mélange Alanine + Glycine. Synthèse de la cyclo-alanyl-glycine	
Action de la glycérine sur le mélange Alanine + Glycine	275
Produit fondamental de la condensation. Cyclo-alanyl-glycine . .	278
Analyse centésimale	278
Point de fusion	279
Isomérisation des cyclo-alanyl-glycines	280
Chapitre XVI. — Action de la glycérine sur le mélange Leucine + Glycine. Synthèse de la cyclo-leucyl-glycine	
Action de la glycérine sur le mélange Leucine + Glycine	282
Produit fondamental de la condensation. Cyclo-leucyl-glycine . .	285
Analyse centésimale	285
Point de fusion	286
Isomérisation des cyclo-leucyl-glycines	286
Chapitre XVII. — Action de la glycérine sur le mélange Leucine + Valine. Synthèse de la cyclo-leucyl-valine.	
Première préparation de cyclo-leucyl-valine	290
Deuxième préparation de cyclo-leucyl-valine.	293
Troisième préparation de cyclo-leucyl-valine.	294
Propriétés de la cyclo-leucyl-valine.	294

Analyse centésimale	295
Isomérisation des cyclo-leucyl-valines	296
Conclusions	297

QUATRIÈME PARTIE

ACTION DES SUCRES SUR LES ACIDES α -AMINÉS.

FORMATION DES MATIÈRES HUMIQUES ET MÉLANOÏDIQUES

Chapitre XVIII. — Action du d.glucose sur le glyocolle. . . .	301
But de la recherche.	301
I. — <i>Action du d.glucose en excès sur le glyocolle</i>	302
Réaction du d.glucose sur le glyocolle à 100°, en milieu aqueux.	302
Réaction du d.glucose sur le glyocolle vers 150°, en milieu aqueux	303
Réaction du d.glucose sur le glyocolle à 40°	303
Réaction du d.glucose sur le glyocolle à 34°	304
Nature du dégagement gazeux : anhydride carbonique	304
Origine du gaz carbonique	305
Essais de dosage de CO ² dégagé dans un courant d'oxygène.	305
Dégagement de CO ² en atmosphère limitée d'oxygène.	306
Dégagement de CO ² en atmosphère limitée d'azote	308
Dégagement de CO ² en atmosphère limitée d'hydrogène	310
Dégagement de CO ² en l'absence de toute atmosphère.	312
Bilan élémentaire de la réaction du glucose et du glyocolle.	312
Interprétation constitutionnelle de la réaction	318
Caractères des substances brunes formées. I. Substances solubles dans l'eau	320
Caractères des substances brunes formées. II. Formation de substances insolubles dans l'eau	323
Caractères des substances brunes formées. III. Composition centésimale de la fraction insoluble principale	325
Caractères des substances brunes formées. IV. Action des réactifs sur les matières insolubles dans l'eau	328
II. — <i>Action du d.glucose sur le glyocolle en excès</i>	330
Réaction du d.glucose sur un excès de glyocolle	330
Etude des produits solubles dans l'eau	334
Etude du résidu insoluble dans l'eau	332
Conclusions	333
Chapitre XIX. — Action de divers sucres sur divers acides aminés	335

Action du d. glucose sur divers acides aminés, vers 100°	335
Action de divers sucres sur le glycolle, vers 100°	337
Action du glycolle sur le xylose, à 40°	338
Action du glycolle sur le xylose, à 34°	339
Chapitre XX. — Action des sucres sur certains polypeptides	341
Recherche de la réaction sur les chaînes polypeptidiques	341
Action de la glycyl-glycine sur le xylose, à 75°	341
Action de la glycyl-glycine sur le glucose, à 75°	343
Action de la glycyl-glycine sur le xylose, à 40°	344
Action de la glycyl-glycine sur le glucose, à 40°	344
Action de la glycyl-glycine sur le xylose, à 34°	345
Action de la glycyl-glycine sur le glucose, à 34°	345
Action des peptones sur les sucres	346
Chapitre XXI. — Relations, avec diverses substances de constitution inconnue, des produits d'action des acides aminés sur les sucres	348
Relations avec les substances caramélisées	348
Relations avec les substances non azotées dites matières humiques artificielles	354
Relations avec les véritables matières humiques azotées	365
Relations avec les combustibles minéraux	378
Relations avec les substances mélanoidiques	386
Relations avec les matières brunes des industries alimentaires	394

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Première partie. — Action de la glycérine sur le glycolle (synthèse de la cyclo-glycyl-glycine et des chaînes polyglycyl-iques paires)	397
Deuxième partie. — Action de la glycérine sur les homologues du glycolle, isolés (synthèse des cyclo-glycyl-glycines homogènes)	407
Troisième partie. — Action de la glycérine sur les homologues du glycolle, en mélange (synthèse des cyclo-glycyl-glycines mixtes)	412
Quatrième partie. — Action des sucres sur les acides α -aminés (formation des matières humiques et mélanoidiques)	416

INTRODUCTION

Les recherches qui font l'objet du présent mémoire, et dans lesquelles j'ai étudié les phénomènes de condensation de divers ordres que subissent les acides α -aminés en présence de la glycérine et des sucres, ne sont qu'un très petit fragment de la somme énorme de travail qu'ont dû fournir les chimistes, depuis près d'un siècle bientôt, dans l'espoir d'élucider, par la double voie analytique et synthétique, le problème des albuminoïdes.

Si parmi les questions dont la solution même n'appartient qu'à la Chimie, un grand nombre dépasse en portée les limites de cette science par la répercussion qu'elles peuvent avoir sur d'autres branches du savoir humain, il n'en est aucune, je crois, dont l'importance puisse être comparée sous ce rapport à celle de la synthèse albuminoïde. Celle-ci domine l'étendue tout entière des sciences biologiques : si l'audace du chercheur peut espérer quelque jour faire la brèche définitive dans les remparts de mystère dont s'entoure encore le problème de la « vie », c'est en dévoilant dans son principe comme dans tous ses détails le *mécanisme de la formation naturelle des albuminoïdes chez les êtres vivants*, mécanisme dont la découverte ne saurait être contrôlée que par la reproduction synthétique de ces substances. Nul n'ignore leur rôle fondamental dans la structure de nos cellules : sans vouloir prétendre que la synthèse complète de ces matières nous ferait du coup les créateurs d'un véritable être vivant, du moins n'est-il pas interdit de croire qu'elle pourrait suggérer, soit à la biologie pure, soit à ses applications agronomiques ou médicales, des progrès aussi considérables que ceux dont ont bénéficié, par la domestication de substances plus simples, les branches industrielles de la chimie appliquée.

C'est à cette recherche d'un mécanisme de synthèse des matières albuminoïdes, et spécialement d'un mécanisme se rapprochant autant que possible de ceux que peuvent utiliser les êtres vivants, que je me suis efforcé d'apporter une contribution personnelle. Si modeste qu'elle

puisse être en elle-même, je suis convaincu qu'une contribution de ce genre ne saurait rester inutile à la solution du grand problème dont il s'agit.

I. — IMPORTANCE DES ACIDES AMINÉS DANS LA CONSTITUTION DES ALBUMINOÏDES

L'étude constitutionnelle des matières albuminoïdes, préface obligatoire de leur reproduction synthétique, remonte assez haut dans l'histoire de la Chimie. Il y aura dans quelques années un siècle déjà que notre compatriote H. BRACONNOT (1), en traitant la gélatine par l'acide sulfurique fort, sut obtenir en abondance le « sucre de gélatine », le *glycocolle*, qui devait être reconnu plus tard comme un acide aminé, le type même de la série, dont il est le premier terme. En attaquant de la même façon la matière musculaire, H. BRACONNOT découvrait la *leucine*, moins pure sans doute que celle dont nous pouvons disposer aujourd'hui, mais dont l'intérêt n'était pas moins considérable pour la constitution des albuminoïdes. H. BRACONNOT tenait en 1820 les premiers représentants de la série dont ses successeurs allaient accroître l'importance numérique et fonctionnelle.

Au cours du XIX^e siècle se succèdent un grand nombre de recherches où toujours nous voyons la décomposition des matières protéiques fournir plusieurs de ces corps que nous rangeons aujourd'hui dans le groupe des acides aminés. Dès 1849, F. BOPP (2), en décomposant par l'acide sulfurique l'albumine de l'œuf, la caséine du lait, la fibrine du sang, en retire non seulement la *tyrosine* et la *leucine*, mais encore une substance nouvelle, d'allure très particulière, que nous retrouverons au cours de ce travail sous le nom de « leucinimide », et qui n'est autre qu'un double anhydride de la leucine, une *cyclo-leucyl-leucine*.

H. HLASIWETZ et J. HABERMANN retrouvent cette leucinimide, à côté des acides aminés, dans les produits d'action du brome aqueux sur les albuminoïdes (3), tandis que la décomposition des albuminoïdes

1. H. BRACONNOT. Mémoire sur la conversion des matières animales en nouvelles substances par le moyen de l'acide sulfurique (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 13, 113, 1820).

2. F. BOPP. Einiges über Albumin, Casein, und Fibrin (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 69, 16, 1849).

3. H. HLASIWETZ u. J. HABERMANN. Ueber die Proteinstoffe (Einwirkung von Brom) (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 159, 304, 1871).

par l'acide chlorhydrique étendu de son volume d'eau, en présence de chlorure stanneux (1), leur fournit régulièrement une série d'acides aminés : *leucine*, *tyrosine*, *acide aspartique*, *acide glutamique*.

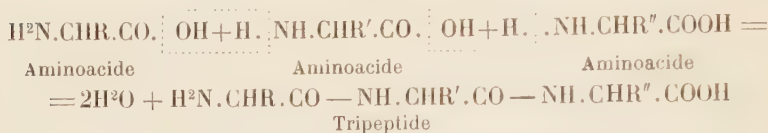
Il ne saurait être question de passer ici en revue, même sous forme de simple énumération, les nombreux mémoires auxquels a donné lieu le démembrement des molécules protéiques par divers agents, acides, alcalis, oxydants. Mais il me semblerait impossible de parler du rôle des acides aminés dans la structure de ces molécules protéiques, sans rendre hommage à l'œuvre fondamentale de P. SCHUTZENBERGER, dont les recherches sagaces et patientes, publiées dans une longue série de mémoires (2) à partir de 1875, ont établi d'une manière définitive ce rôle prépondérant des aminoacides.

On sait aujourd'hui que tous les acides aminés obtenus à partir des albuminoïdes sont des acides aminés en position α , c'est-à-dire portent dans leur molécule la fonction basique au voisinage immédiat de la fonction acide. Cette disposition structurale fait que ces deux fonctions ne réagissent pas l'une sur l'autre à l'intérieur de la même molécule ; mais la fonction acide d'une molécule a la faculté de s'unir à la fonction basique de sa voisine, et ainsi de suite, pour constituer des chaî-

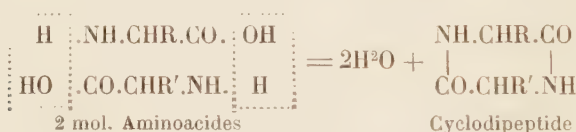
1. H. HLASIWETZ u. J. HABERMANN. Ueber die Proteinstoffe (Einwirkung von Salzsäure und Zinnchlorür) (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 169, 150, 1873).

2. P. SCHUTZENBERGER. Recherches sur les matières albuminoïdes (*C. R. Ac. Sc.*, 80, 232, 1875). — Recherches sur l'albumine et les matières albuminoïdes. Premier mémoire (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 23, 161, 216, 242, 1875). — Deuxième mémoire sur l'albumine et les matières protéiques (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 24, 2, 1875). — Recherches sur la constitution des matières albuminoïdes. Troisième mémoire (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 24, 145, 1875). — Recherches sur la constitution des matières albuminoïdes (*C. R. Ac. Sc.*, 81, 1108, 1875). — Recherches sur la constitution de la fibroïne de la soie (avec A. BOURGEOIS) (*C. R. Ac. Sc.*, 81, 1191, 1875). — Suite et fin du troisième mémoire sur les matières albuminoïdes (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 25, 147, 1876). — Recherches sur la constitution des matières collagènes (avec A. BOURGEOIS) (*C. R. Ac. Sc.*, 82, 262, 1876). — Note sur un nouveau dérivé des matières albuminoïdes (*C. R. Ac. Sc.*, 84, 124, 1877). — Sur la constitution de la laine et de quelques produits similaires (*C. R. Ac. Sc.*, 86, 767, 1878). — Mémoire sur les matières albuminoïdes (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 5^e s., 16, 289, 1879). — Albuminoïdes (matières). Article du *Dictionnaire de Chimie de Würtz*, 1^{er} supplément, t. 1, p. 54-76. — Nouvelles recherches sur les matières protéiques (*C. R. Ac. Sc.*, 101, 1267, 1885). — Recherches sur la gélatine (*C. R. Ac. Sc.*, 102, 1296, 1886). — Recherches sur la constitution chimique des peptones (*C. R. Ac. Sc.*, 115, 208, 1892). — Recherches sur la constitution chimique des peptones (*C. R. Ac. Sc.*, 115, 764, 1892).

nes plus ou moins longues, linéaires ou fermées, en accumulant les tronçons d'acides aminés par voie de déshydratation :



Dans l'exemple ci-dessus, l'union de trois molécules d'acides aminés, avec élimination de $3 - 1 = 2$ molécules d'eau, donne naissance à une molécule unique formée par l'enchaînement de trois tronçons d'acides aminés en chaîne linéaire, à un *tripeptide* suivant l'expression de E. FISCHER. Dans le cas où les deux fonctions terminales de la nouvelle chaîne, acide et basique, réagissent l'une sur l'autre, on obtient une molécule cyclique. Il en est fréquemment ainsi dans le cas des dipeptides, qui se présentent alors sous la forme de *cyclodipeptides*, substances auxquelles sera consacrée une partie du présent travail :



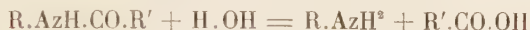
On considère aujourd'hui les matières albuminoïdes comme formées essentiellement, pour une partie prépondérante de leur molécule tout au moins, d'un semblable entassement d'acides aminés, enchaînés les uns aux autres par déshydratation entre les groupes carboxyle $-\text{COOH}$ et aminogène $-\text{NH}^2$, c'est-à-dire par le chaînon $-\text{CO}-\text{NH}-$ répété un nombre plus ou moins grand de fois dans l'intérieur de la molécule. C'est la rupture successive de ces chaînons $-\text{CO}-\text{NH}-$ par l'hydratation, qui produit la dégradation progressive de la matière albuminoïde sous l'action des réactifs ou des ferments, en l'amenant, à travers des stades variés d'albumoses et de peptones, jusqu'à l'état définitif de simples acides aminés. Les peptones elles-mêmes doivent donc être considérées encore comme des chaînes complexes d'acides aminés, et c'est cette conception qui a suggéré à E. FISCHER le nom de peptides ou *polypeptides* pour les chaînes artificielles d'acides aminés que TH. CURTIUS ou E. FISCHER lui-même ont réussi à créer par les procédés synthétiques dont nous dirons plus loin quelques mots.

Mais avant de faire état du rôle prépondérant que les recherches modernes ont attribué, dans la structure des molécules protéiques, à

l'enchaînement réciproque des groupes aminés et carboxylés sous la forme $R.NH.CO.R'$, il nous semblerait injuste de ne pas rappeler ici en quels termes précis P. SCHUTZENBERGER insistait déjà sur cette notion, à la suite de ses travaux sur la décomposition de l'albumine par la baryte à 100° et à 200° .

« Remarquons, disait-il (1), que le nombre des molécules d'eau « fixées pendant la réaction (54 molécules) est très rapproché du nombre des atomes d'azote contenus dans l'albumine (56 atomes). La « différence s'explique naturellement par la production d'anhydrides. « Ainsi le groupe urée $CO(AzH^2)^2$ ne fixe, pour se dédoubler en « $CO^2 + 2AzH^2$, qu'une seule molécule d'eau.

« On peut donc considérer comme prouvé que la rupture de la molécule complexe de l'albumine en divers termes se fait par hydratation « entre des groupes élémentaires azotés et des groupes élémentaires « carboxylés. Le dédoublement est de la forme :



« R et R' représentant des résidus quelconques plus ou moins complexes.

« Ce fait capital est un résultat direct de l'expérience, il domine « l'histoire du dédoublement de l'albumine par la baryte et ne doit « jamais être perdu de vue. »

Cette notion capitale sur laquelle P. SCHUTZENBERGER attirait l'attention en termes si pressants, a conservé dans les conceptions actuelles toute sa valeur, bien qu'on ait eu parfois tendance à perdre de vue son origine. Laissons en effet de côté la production de l'urée par hydratation secondaire, sous l'action de la baryte, de l'arginine dont on ne connaissait pas, au temps de P. SCHUTZENBERGER, la présence dans les albuminoïdes, et considérons la partie principale de la molécule. Si, dans ses recherches, P. SCHUTZENBERGER était parvenu à transformer la presque totalité de l'albumine en acides aminés, nul doute qu'il eût reconnu la grande généralité du mode de liaison ($-CO-AzH-$) entre carboxyle et aminogène, liaison sur laquelle il venait lui-même d'attirer l'attention. Mais, alors que l'hydrolyse du blanc d'œuf par la baryte à 200° lui avait effectivement fourni de la tyrosine et des leucines (alanine, acides aminobutyrique et aminovalérique, leucine), il restait néanmoins une forte proportion (plus de la moitié) de l'albumine sous forme de substances variées, auxquelles P. SCHUTZENBERGER donnait

1. P. SCHUTZENBERGER. *Traité de Chimie générale*, t. VI, p. 150. Paris, 1890.

les noms d'*acides hydroprotéiques, leucéines, acides protéiques, glucoprotéïnes* β , et dans lesquelles il supposait que l'azote, engagé dans des liaisons de la forme $-(CH^2)_n-AzH-(CH^2)_n'$, n'était pas en relation avec le carboxyle.

Le caractère encore incomplet de ces conclusions, en ce qui concerne le rôle constitutionnel des acides aminés, résultait du caractère incomplet de l'hydrolyse par la baryte, hydrolyse qui peut bien résoudre en leurs constituants une partie des associations d'acides aminés, les moins résistantes, mais non toutes. Les recherches modernes, reprises en utilisant l'action des acides minéraux, plus énergique et plus profonde que celle de la baryte, ont étendu les résultats de P. SCHUTZENBERGER. C'est ainsi que dans ces dernières années, L. HUGOUNEQ et A. MOREL (1), isolant d'abord par la baryte des glucoprotéïnes et des leucéïnes au sens de P. SCHUTZENBERGER, ont pu ensuite, par l'hydrolyse acide, résoudre ces substances à leur tour en mélanges d'acides aminés, démontrant ainsi qu'elles n'étaient que des polypeptides de résistance particulière à l'hydrolyse barytique, et non point des molécules de constitution spéciale.

Sur les entrefaites, la liste des acides aminés extraits des molécules protéiques s'était enrichie. Non seulement on connaissait, dans ces molécules, la présence des acides aminés simples, c'est-à-dire munis d'une seule fonction acide et d'une seule fonction amine (*glycocolle, alanine, valine, leucine*), mais on y ajoutait deux acides doubles à fonction basique simple, deux diacides monoaminés, l'*acide aspartique* et l'*acide glutamique*, dont la présence, démontrée par H. RITTHAUSEN (2) dès 1869 dans les matières albuminoïdes végétales, avait été retrouvée par H. HLASIWETZ et J. HABERMANN dans les substances protéiques animales. Inversement on commençait d'y connaître le rôle de certains monoacides diamminés, dont le premier, la *lysine*, avait été découvert par E. DRECHSEL (3) dès 1880. En 1895, S. G. HEDIN (4) trouvait parmi

1. L. HUGOUNEQ et A. MOREL. Contribution à l'étude de la constitution des matières albuminoïdes. Recherches sur la vraie nature des glucoprotéïnes et leucéïnes de Schützenberger (*Bull. Soc. chim.*, 4^e s., 1, 154, 1907).

2. H. RITTHAUSEN. Asparaginsäure und Glutaminsäure, Zersetzungsprodukte des Legumins und Conglutins (*Journ. f. prakt. Chem.*, 107, 218, 1869).

3. E. DRECHSEL. Ueber die Bildung des Harnstoffs im tierischen Organismus (*Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth.*, 1880, 550). — Ueber die Bildung von Harnstoff aus Eiweiss (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 23, 3096, 1890). — Der Abbau der Eiweissstoffe (*Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth.*, 1894, 248).

4. S. G. HEDIN. Ueber ein neues Spaltungsprodukt der Hornsubstanz

les fragments de la molécule albuminoïde l'*arginine* antérieurement découverte par E. SCHULZE et E. STEIGER (1) dans les plantules en germination, et ce corps n'est autre chose qu'une guanidine complexe que l'hydrolyse dédouble en urée et en un acide diaminé homologue inférieur de la lysine, l'*ornithine*, déjà connue par ailleurs. Enfin les belles recherches de A. KOSSEL (2) sur les constituants basiques des molécules albuminoïdes et notamment des protamines le conduisaient à découvrir, à côté de la lysine et de l'arginine, une troisième base « hexonique », l'*histidine* (1898).

L'*histidine* de A. KOSSEL devait être reconnue plus tard (H. PAULY, 1904) comme une alanine substituée par un noyau glyoxalinique, comme une *imidazolalanine* (3), comparable à la *tyrosine* connue depuis longtemps et qui est une *para-orythénylalanine*. La *phénylalanine* elle-même avait été rencontrée dès 1881 par E. SCHULZE et J. BARBIERI (4) dans les produits d'hydrolyse des albuminoïdes végétaux puis animaux. Enfin le *tryptophane*, depuis longtemps observé dans la digestion pancréatique, avait été reconnu en 1895 par M. NENCKI (5) pour un acide aminé dérivé de l'indol; continuée par F.-G. HOPKINS et S.-W.

(*Z. physiol. Chem.*, 20, 186, 1895). — Eine Methode, das Lysin zu isolieren, nebst einigen Bemerkungen über das Lysatinin (*Z. physiol. Chem.*, 21, 297, 1896).

1. E. SCHULZE u. E. STEIGER. Ueber einen neuen stickstoffhaltigen Bestandtheil der Keimlinge von *Lupinus luteus* (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 19, 1177, 1886). — Ueber das Arginin (*Z. physiol. Chem.*, 11, 43, 1886).

2. A. KOSSEL. Ueber die basischen Stoffe des Zellkerns (*Z. physiol. Chem.*, 22, 176, 1898). — Ueber die Konstitution der einfachsten Eiweissstoffe (*Z. physiol. Chem.*, 25, 163, 1898). — A. KOSSEL u. FR. KUTSCHER. Ueber das Histidin (*Z. physiol. Chem.*, 28, 382, 1899).

3. H. PAULY. Ueber die Konstitution des Histidins (*Z. physiol. Chem.*, 42, 508, 1904).

4. E. SCHULZE u. J. BARBIERI. Ueber das Vorkommen von Phenylamidopropionsäure unter der Zersetzungsprodukten der Eiweissstoffe (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 14, 1785, 1881). — Ueber Bildung von Phenylamidopropionsäure beim Erhitzen von Eiweissstoffen mit Salzsäure und Zinnchlorür (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 1711, 1883). — E. SCHULZE. Untersuchungen über die Amidosauren, welche bei der Zersetzung der Eiweissstoffe durch Salzsäure und durch Barytwasser entstehen (*Z. physiol. Chem.*, 9, 63, 253, 1885).

5. M. NENCKI. Zur Kenntniss der pankreatischen Verdauungsproducte des Eiweisses (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 28, 560, 1895).

COLE (1), son étude aboutit en 1907 à l'identifier avec une *indol-Pr-3-alanine* (A. ELLINGER et CL. FLAMAND (2)).

Cette tendance tout à fait remarquable de l'alanine à s'annexer des groupements atomiques variés, n'est pas relative seulement aux noyaux cycliques, mais se manifeste aussi vis-à-vis des fonctions d'alcool ou de thiol. C'est ainsi que les albuminoïdes fournissent parmi leurs produits d'hydrolyse une β -*oxyalanine*, qui n'est autre que la *sérine* depuis très longtemps découverte (3) dans la décomposition de la soie (E. CRAMER, 1865), et que E. FISCHER et ses élèves ont retrouvée dans les constituants de la soie d'abord (4), puis dans une foule d'autres matières protéiques. Sur un plan tout parallèle est construite la molécule sulfurée de la *cystéine* (β -thio-alanine), qui s'extrait des fractionnements, soit en nature, soit sous la forme condensée de *cystine*, rencontrée d'abord (5) dans la fibrine (E. KÜLZ, 1890), puis (6) dans les matières kératiniques (EMMERLING, 1894) et dans bien d'autres protéiques, depuis les travaux de K. A. H. MÖRNER (7).

C'est seulement depuis quelques années, qu'aux aminoacides simples déjà connus dans les molécules protéiques, est venu s'en joindre un nouveau, l'*isoleucine*, d'abord trouvée par F. EHRLICH (8) en 1904 dans les mélasses de betterave, mais dont la présence à côté de la leucine dans les albuminoïdes eux-mêmes est aujourd'hui démontrée (9).

Les auteurs modernes, renonçant à l'hydrolyse barytique, trop

1. F. G. HOPKINS et S. W. COLE. A contribution to the chemistry of proteids. Part I. Preparation of tryptophane (*Journ. of Physiol.*, 27, 418, 1901). — A contribution to the chemistry of proteids. Part II. The constitution of Tryptophan and the action of Bacteria upon it (*Journ. of Physiol.*, 29, 431, 1903).

2. A. ELLINGER et CL. FLAMAND. Ueber die Konstitution der Indolgruppe im Eiweiss. IV Vorläufige Mittheilung. Synthese des razemischen Tryptophans (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 40, 3029, 1907). — Ueber synthetisch gewonnenes Tryptophan und einige seiner Derivate (*Z. physiol. Chem.*, 55, 8, 1908).

3. E. CRAMER. Ueber die Bestandteile der Seide (*Journ. f. prakt. Chem.*, 96, 76, 1865).

4. E. FISCHER et A. SKITA. Ueber das Fibrin der Seide (*Z. physiol. Chem.*, 33, 177, 1901). — Ueber das Fibrin und den Leim der Seide (*Z. physiol. Chem.*, 35, 221, 1902).

5. E. KÜLZ. Zur Kenntniss des Cystins (*Z. f. Biolog.*, N. F., 9, 417, 1890).

6. EMMERLING. *Chemiker Zeitung*, 1894, p. 1539.

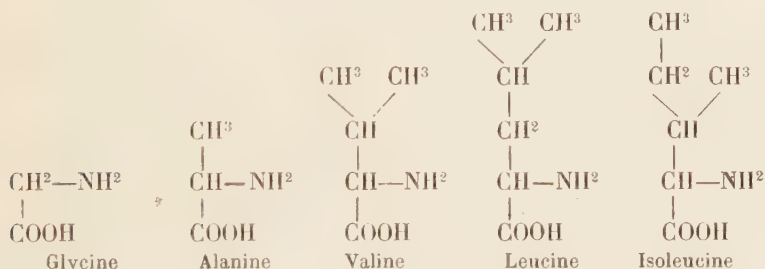
7. K. A. H. MÖRNER. Cystin, ein Spaltungsprodukt der Hornsubstanz (*Z. physiol. Chem.*, 28, 593, 1899).

8. F. EHRLICH. Ueber das natürliche Isomere des Leucins (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1809, 1904).

9. F. EHRLICH et A. WENDEL. Zur Kenntniss der Leucinfraction des Eiweisses (*Biochem. Zeitschr.*, 8, 399, 1908). — P. A. LEVENE et DONALD

incomplète, ont exécuté tous leurs travaux par le moyen de l'hydrolyse acide, par ébullition soit dans l'*acide sulfurique* à 25 0/0 (A. KOSSEL et ses élèves), soit dans l'*acide chlorhydrique concentré* tel que le fournit le commerce. C'est cette dernière technique, préconisée par R. COHN (1), qu'ont adoptée E. FISCHER, E. ABDERHALDEN, et leurs élèves ou leurs imitateurs, pour les très nombreuses décompositions de matières protéiques auxquelles ils se sont livrés. Enfin, plus récemment encore, après une étude critique des divers modes d'hydrolyse, L. HUGOUNENQ et A. MOREL (2) ont recommandé comme agent de choix l'*acide fluorhydrique* en solution aqueuse à 20 0/0 environ, dont l'action, tout en étant aussi énergique que celle des acides chlorhydrique ou sulfurique, a le précieux avantage de respecter beaucoup plus les fragments moléculaires d'abord isolés, et de ne leur faire subir qu'un minimum d'altérations secondaires.

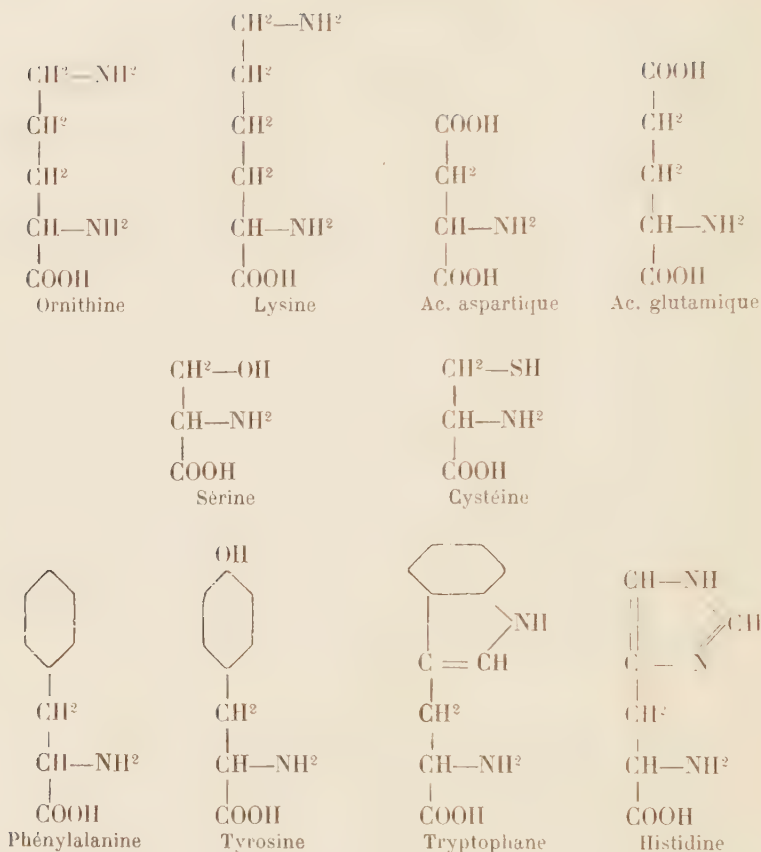
En l'état actuel de nos connaissances, les divers aminoacides dont on a constaté avec certitude la présence, sinon dans chaque espèce de molécule albuminoïde, du moins dans l'ensemble du groupe, sont les suivants : glycocolle (glycine), alanine, valine, leucine, isoleucine ; ornithine, lysine ; acide aspartique, acide glutamique ; sérine, cystéine ; phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine. Leurs formules de constitution sont rassemblées dans le tableau suivant :



D. VAN SLYKE. The Leucin Fraction of Proteins (*Journ. of biolog. Chem.*, 6, 391, 1909). — The Leucin Fraction in Casein and Edestin (*Journ. of biolog. Chem.*, 6, 449, 1909).

1. R. COHN. Ueber die Abspaltung eines Pyridinderivates aus Eiweiss durch Kochen mit Salzsäure (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 29, 1785, 1896). — Ueber eine quantitative Eiweisspaltung. I Mittheilung. Auffindung eines Pyridinderivates (*Z. physiol. Chem.*, 22, 153, 1896).

2. L. HUGOUNENQ et A. MOREL. Sur un perfectionnement dans la technique d'hydrolyse des matières protéiques. L'emploi de l'acide fluorhydrique et ses avantages (*Bull. Soc. chim.*, 4^e s., 3, 1446, 1908).

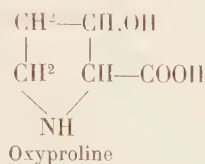
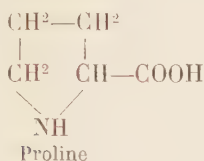


A l'exception du glycolle, tous les aminoacides dont les molécules sont ici formulées, possèdent un atome de carbone asymétrique, celui qui porte la fonction aminée. Ils existent donc sous deux formes antipodes optiques, qui pour la plupart ont été obtenues par la synthèse, grâce surtout aux travaux de E. FISCHER (1). Dans les matières protéiques naturelles, un seul des deux antipodes paraît exister : si le fractionnement des produits d'hydrolyse livre souvent une certaine quantité d'aminoacides racémiques, il semble qu'une racémisation partielle soit intervenue secondairement au cours des manipulations.

Aux divers acides aminés qui viennent d'être énumérés, il faudrait

1. Voir notamment : E. FISCHER. Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. Berlin, 1906.

joindre encore deux aminoacides cycliques, la *proline* (1) et l'*oxyproline* (2), dont la découverte parmi les fragments d'hydrolyse est due aux travaux de E. FISCHER :



Mais nous devons aujourd'hui nous demander si la proline et l'oxyproline sont bien des constituants authentiques des molécules albuminoïdes, c'est-à-dire si le noyau pyrrolidique préexiste réellement dans celles-ci, ou s'il ne se formerait pas secondairement par altération au cours du travail. On sait que l'acide glutamique, par exemple, donne naissance aisément à de l'acide pyrrolidonecarbonique. Tout récemment encore, E. ABDERHALDEN et A. WEIL (3) ont constaté qu'en soumettant l'acide glutamique pur aux mêmes opérations que l'on emploie dans la technique de E. FISCHER pour le fractionnement des produits d'hydrolyse, on perd environ 30 0/0 de cet acide glutamique par altération, et notamment par transformation en dérivés pyrrolidiques.

Il faudrait enfin rappeler quelques substances plus complexes, comme l'*acide oxyaminosubérique* $\text{C}^8\text{H}^{15}\text{NO}^5$ et l'*acide oxydiaminosébacique* $\text{C}^{10}\text{H}^{20}\text{N}^2\text{O}^5$ signalés par J. WOHLGEMUTH (4) dans l'hydrolyse du nucléoprotéide hépatique, comme l'*acide dioxydiaminosubérique* $\text{C}^8\text{H}^{16}\text{N}^2\text{O}^6$, l'*acide caséinique* $\text{C}^9\text{H}^{16}\text{N}^2\text{O}^7$ (acide nonanoldiaminotrioïque ?) et l'*acide caséinique* obtenus par ZD. SKRAUP (5) dans le démembrement de la

1. E. FISCHER. Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure (*Z. physiol. Chem.*, 33, 451, 1901). — Ueber die Entstehung von α -Pyrrolidincarbonensäure und Phenylalanin bei der Hydrolyse des Eieralbumins (*Z. physiol. Chem.*, 33, 412, 1901).

2. E. FISCHER. Ueber eine neue Aminosäure aus Leim (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 35, 2660, 1902).

3. E. ABDERHALDEN u. A. WEIL. Ueber die bei der Isolierung der Monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste. I Mitteilung (*Z. physiol. Chem.*, 74, 445, 1911).

4. J. WOHLGEMUTH. Zur Hydrolyse des Leberproteïds (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 4362, 1904). — Ueber das Nucleoproteïd der Leber. IV Mitteilung (*Z. physiol. Chem.*, 44, 530, 1905).

5. ZD. SKRAUP Ueber die Hydrolyse des Caseïns (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1596, 1904). — Ueber die Hydrolyse des Caseïns durch Salzsäure (*Z. physiol. Chem.*, 42, 274, 1904; *Monatsh. f. Chem.*, 25, 633, 1904).

caséine, ou encore l'*acide gélatinique* $C^{12}H^{25}N^5O^{10}$ du même auteur (1). E. FISCHER (2) considère l'acide caséinique de ZD. SKRAUP comme n'étant autre chose qu'un échantillon incomplètement purifié du corps que E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (3) ont eux-mêmes obtenu, sous le nom d'*acide diaminotrioxydodécanoïque* $C^{12}H^{26}N^2O^5$, à partir de la caséine décomposée par H^2SO^4 à 25 0/0. Mais nous ne sommes pas encore fixés sur la constitution exacte de ces corps, ni sur l'importance de leur rôle dans la structure des albuminoïdes.

On remarquera, en effet, que de tous les acides α -aminés trouvés dans les molécules protéiques et dont la constitution est complètement déterminée, aucun, si l'on fait abstraction des noyaux cycliques fixés sur l'alanine, ne possède une chaîne carbonée d'ordre supérieur à 6. Il est bien vrai qu'un *acide aminostéarique* $C^{18}H^{35}(NH^2)O^2$ a été autrefois rencontré par A. GAUTIER et A. ETARD (4) dans les produits de putréfaction de la viande, mais rien n'autorise à conclure que sa molécule préexistait dans celle des protéiques de la viande, et n'est pas le résultat d'un remaniement, par les bactéries, des produits primitifs de décomposition.

Les acides aminés seuls ne suffisent pas à constituer les matières albuminoïdes : il ne faut pas perdre de vue le groupement de cyanamide que l'on peut considérer comme additionné à l'ornithine dans cette *guanidine* complexe qu'est l'arginine. L'arginine fait partie intégrante de toutes les molécules albuminoïdes, et son squelette guanidique est le générateur de l'urée qu'obtenait P. SCHUTZENBERGER dans l'hydrolyse par la baryte.

Il ne faut pas oublier non plus les *sucres*. Dans certaines substances protéiques, telles que les mucines, le groupement sucré se détache si aisément de la molécule qu'on l'a considéré comme accessoire, comme un groupement prosthétique surajouté à la molécule albuminoïde proprement dite pour constituer un protéide, un *glucoprotéide* ; mais dans d'autres matières, comme l'albumine du blanc d'œuf par exemple, et d'autres encore, il semble qu'une destruction profonde de la molécule

1. ZD. SKRAUP. Ueber die Hydrolyse der Eiweissstoffe. II Abt. Die Gelatine (*Monatsh. f. Chem.*, 26, 243, 1905).

2. E. FISCHER. Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (p. 71). Berlin, 1906.

3. E. FISCHER u. E. ABDERHALDEN. Notizen über Hydrolyse von Proteinstoffen. I. Hydrolyse des Caseïns (*Z. physiol. Chem.*, 42, 340, 1904).

4. A. GAUTIER et A. ETARD. Sur les produits dérivés de la fermentation bactérienne des albuminoïdes (*C. R. Ac. Sc.*, 97, 263, 1883).

albuminoïde elle-même soit nécessaire pour libérer le groupement sucré, qui en ferait ainsi véritablement partie.

On comprendra d'ailleurs par la suite de ce travail, lorsque j'exposerai le résultat de mes études sur l'action mutuelle des sucres et des aminoacides, et la formation méthodique des mélanoidines que j'ai découverte à cette occasion, que les fragments sucrés ont dû souvent passer inaperçus dans la décomposition des albuminoïdes, et que nos connaissances sur ce point laissent encore certainement à désirer.

Quoi qu'il en soit, il est certain que les acides α -aminés représentent la partie prépondérante de l'architecture albuminoïde, et c'est par leur enchaînement mutuel que la Chimie doit faire ses premiers pas dans la voie de la synthèse complète des protéiques. Il ne sera sans doute pas inutile, avant d'exposer la modeste contribution personnelle que je me suis efforcé d'apporter à la question, de rappeler brièvement les tentatives empiriques ou méthodiques déjà faites par les chimistes les plus éminents, et les résultats fort intéressants qu'elles ont fournis.

II. — ESSAIS DE CONDENSATION DIRECTE DES ACIDES AMINÉS EN MOLÉCULES ALBUMINOÏDES

A une époque où l'on discutait encore pour savoir si la transformation des albuminoïdes en peptones est, oui ou non, un phénomène d'hydratation, A. HENNINGER (1) pensa que le meilleur argument en faveur de cette conception consisterait à remonter des peptones aux albuminoïdes à l'aide des agents déshydratants. Après avoir essayé sans succès plusieurs de ces agents, il réussit, en chauffant à 80° pendant une heure un mélange de fibrine-peptone (10 parties) et d'anhydride acétique (25 parties), à obtenir une substance soluble dans l'eau en présence d'un peu d'acide ou d'alcali, mais précipitable par neutralisation (à la manière des syntonines), se troublant par la chaleur, par l'acide nitrique ou le ferrocyanure acétique.

Dès qu'il eut connaissance de l'expérience de A. HENNINGER, FR. HOFMEISTER (2), qui avait déjà obtenu, en desséchant la gélatine pendant

1. A. HENNINGER. Recherches sur les peptones (*C. R. Ac. Sc.*, 86, 1464, 1878).

2. FR. HOFMEISTER. Ueber die Rückbildung von Eiweiss aus Pepton (*Z. physiol. Chem.*, 2, 206, 1878).

longtemps à 130°, une substance analogue au collagène, chauffa pendant quelques heures à 140° (ou pendant quelques instants à 160°-170°) des peptones de fibrine. Le produit, de couleur brune, dégageant des vapeurs alcalines, était en partie soluble dans l'eau, et la solution ressemblait à celle d'une globuline, se troublant par la dilution, se clarifiant par addition de NaCl, coagulant par la chaleur, précipitant par l'acide nitrique, le ferrocyanure acétique, les sels des métaux lourds. Quant au résidu insoluble dans l'eau pure, il se dissolvait, à la manière des syntonines, en présence d'une trace d'acide ou d'alcali, montrait les réactions colorées des albuminoïdes, précipitait par l'acide nitrique, le ferrocyanure acétique, et par des sels métalliques qui, comme le sulfate de cuivre et l'acétate de plomb, ne précipitaient pas la peptone. Il semble bien qu'il y ait eu vraiment retour, par déshydratation, à des substances plus condensées que les peptones.

Mais dans ces tentatives, les peptones servant de point de départ étaient si peu éloignées du but à atteindre, que le résultat ne pouvait être fort instructif au point de vue de la synthèse des albuminoïdes, étant donné surtout que les substances d'où l'on partait étaient tout aussi mystérieuses que les albumines elles-mêmes, en ce qui concerne leur constitution.

À la suite de ses travaux sur la décomposition des matières protéiques par la baryte, P. SCHUTZENBERGER qui depuis plusieurs années se préoccupait (1) de condenser les leucines et les leucéines avec l'urée et l'oxamide, tenta la synthèse albuminoïde (2) par déshydratation des produits ultimes et cristallisables provenant de l'albumine et de la fibrine. Le mélange des composés aminés $C^nH^{2n+1}AzO^2$ (leucines) et $C^nH^{2n-1}AzO^2$ (leucéines), additionné de 10 0/0 environ d'urée et de 4,5 fois son poids d'anhydride phosphorique, se déshydrate quand on le chauffe au bain d'huile à 125°. On obtient une substance soluble dans l'eau, précipitable par l'alcool, qui offre de grandes analogies de caractères avec les peptones. La solution aqueuse précipite par le tannin, l'acide picrique, le sublimé, le nitrate mercurique acide, le réactif de Millon, l'iode ioduré, l'iodomercurate de potassium, l'acide phosphomolybdique et l'acide phosphotungstique en présence de HCl, l'acétate et le sous-acétate de plomb; elle ne précipite pas par le ferrocyanure acétique. Cette pseudo-peptone synthétique donne en rouge

1. P. SCHUTZENBERGER, Recherches sur la synthèse des matières albuminoïdes et protéiques (*C. R. Ac. Sc.*, 106, 1407, 1888).

2. P. SCHUTZENBERGER, Essai sur la synthèse des matières protéiques (*C. R. Ac. Sc.*, 112, 198, 1891).

rosé la réaction du biuret; elle donne par l'acide nitrique à chaud un résidu jaune, qui devient orangé par l'ammoniaque. Elle charbonne et boursoufle en dégageant l'odeur caractéristique des matières animales brûlées.

Plus intéressante que celles de A. HENNINGER et de Fr. HOFMEISTER, puisqu'elle nous fait franchir une distance plus considérable dans la voie de la complication des molécules, l'expérience de P. SCHUTZENBERGER laisse cependant beaucoup à désirer encore, à cause de l'incertitude qui règne sur la constitution des « leucéines » employées. Plus instructifs peut-être sont les essais tentés avec un matériel plus simple, mais de constitution connue.

Dès 1871, E. SCHAAL (1) avait chauffé dans une cornue traversée par un courant de CO^2 sec, du chlorhydrate d'asparagine bien desséché; il élevait progressivement la température jusqu'à 200° , en l'espace de plusieurs jours, jusqu'à cessation complète du dégagement d'eau et d'acide chlorhydrique. Il obtint une masse blanche dure renfermant un corps difficilement soluble dans l'eau $\text{C}^{16}\text{H}^{14}\text{N}^4\text{O}^9$ et un corps tout à fait insoluble $\text{C}^{32}\text{H}^{26}\text{N}^8\text{O}^{17}$. E. SCHAAL considère ces anhydrides comme provenant, le premier, de 4 molécules d'acide aspartique condensées par élimination de 7 molécules d'eau, et le deuxième, de 8 molécules d'acide aspartique condensées avec perte de 15 molécules d'eau. Ces anhydrides se dissolvent dans l'ammoniaque et les alcalis; E. GRIMAU (2) a constaté ultérieurement que le corps $\text{C}^{32}\text{H}^{26}\text{N}^8\text{O}^{17}$ donne en violet la réaction du biuret.

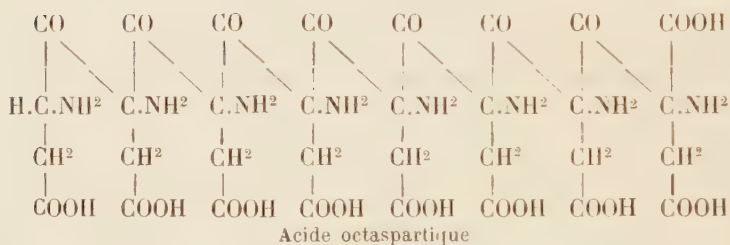
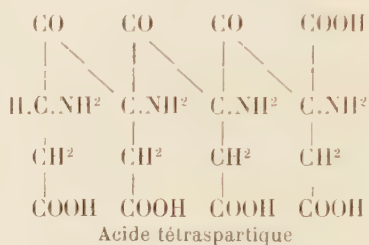
H. SCHIFF (3) a plus récemment repris l'étude de ces deux anhydrides, le *tétraspartide* et l'*octaspartide*, obtenus toujours en déshydratant l'asparagine par la chaleur, et des *acides tétraspartique* $\text{H}(\text{C}^4\text{H}^5\text{NO}^3)^4.\text{OH}$ et *octaspartique* $\text{H}(\text{C}^4\text{H}^5\text{NO}^3)^8.\text{OH}$ qu'ils fournissent lors de leur dissolution facile dans les alcalis. L'acide tétraspartique libre constitue de petits cristaux incolores, groupés en chou-fleur, bien solubles dans l'eau, à peine dans l'alcool, insolubles dans l'éther et le benzène. L'acide octaspartique libre paraît moins bien caractérisé. Bien qu'un certain nombre de dérivés de ces acides polyaspartiques

1. E. SCHAAL. Ueber einige aus Asparaginsäure entstehende Producte (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 157, 24, 1871).

2. E. GRIMAU. Synthèse des colloïdes azotés (*C. R. Ac. Sc.*, 93, 771, 1881). — Sur les colloïdes azotés (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 38, 64, 1882).

3. H. SCHIFF. Ueber Polyaspartsäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 30, 2449, 1897). — Ueber Polyaspartsäuren (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 303, 183, 1898). — Ueber Polyaspartsäuren. Zweite Abhandlung (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 307, 231, 1899).

(sels, hydrazones, anilides, etc.) aient été préparés par H. SCHIFF, il serait fort intéressant de voir confirmer les données de cet auteur, notamment celles sur lesquelles il s'appuie pour considérer comme libres les groupes NH^2 de ces molécules :



Une telle constitution en ferait des substances fort éloignées de tous les autres corps obtenus par la condensation des acides aminés et dans lesquels la soudure doit se faire à l'aide du chaînon double ($-\text{CO}-\text{NH}-$), traduisant l'union du groupe carboxyle d'une molécule avec le groupe aminogène de sa voisine : il serait utile que des recherches nouvelles vissent élucider définitivement la constitution des acides polyaspartiques et des polyaspartides.

E. GRIMAUX (1), lui aussi, partait de l'anhydride aspartique $\text{C}^{22}\text{H}^{26}\text{N}^8\text{O}^{17}$ décrit par E. SCHAAL, préparé en chauffant pendant plusieurs jours à 200° du chlorhydrate d'acide aspartique : poudre blanche complètement insoluble. Quand il chauffe cet anhydride à $125-130^\circ$ avec la moitié de son poids d'urée, pendant deux heures, E. GRIMAUX obtient une masse épaisse, qui donne avec l'eau une solution gommeuse, filtrant difficilement, ne dialysant pas, possédant les propriétés des substances colloïdales. Les acides la précipitent sous forme de gelée compacte ; les sels alcalins, ceux des métaux lourds, le tannin, donnent aussi des précipités gélatineux. L'urée polyaspartique se dissout dans

1. E. GRIMAUX. Synthèse des colloïdes azotés (*C. R. Ac. Sc.*, 93, 771, 1881). — Sur les colloïdes azotés (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 38, 64, 1882).

la potasse et donne en violet la réaction du biuret. L'eau de baryte à 150° le transforme en acide carbonique, ammoniacque et aspartate de baryum. Ce corps répondait donc, dans l'esprit de E. GRIMAU, aux caractères des matières protéiques, qu'il définissait : « Des colloïdes azotés, se dédoublant par hydratation en acide carbonique, en ammoniacque et en acides aminés ». E. GRIMAU attribuait à son uréide polyaspartique la formule $C^{34}H^{40}N^{10}O^{25}$, représentant 8 molécules d'acide aspartique unies à 2 molécules d'urée, avec perte de 2 molécules d'ammoniacque et de 9 molécules d'eau.

L'anhydride polyaspartique chauffé pendant deux heures à 150°, sans urée, mais dans un courant de gaz ammoniac sec, donnait à E. GRIMAU (1) une substance colloïde du même genre (*colloïde amido-aspartique*), précipitant par divers acides et sels, et donnant comme les albumines la réaction du biuret.

E. GRIMAU (2) obtint même un colloïde formé par l'anhydrisation de l'acide amidobenzoïque (méta), sans intervention de l'urée. L'acide amidobenzoïque, chauffé avec du perchlorure de phosphore, fournit une poudre blanche qui se dissout dans l'ammoniacque en formant une solution très lente à filtrer ; évaporée dans le vide, cette solution donne d'abord une gelée épaisse, puis se dessèche en plaques translucides ressemblant à de l'albumine sèche. Le produit sec peut être chauffé à 100° sans perdre sa solubilité dans l'eau ; mais si on évapore la solution au bain-marie, le résidu est devenu complètement insoluble. La solution ammoniacale du *colloïde amidobenzoïque* précipite par les acides minéraux, le ferrocyanure acétique, l'alun, le sublimé, le nitrate mercurieux, le tannin. Cette solution a la propriété remarquable de donner un coagulum vers 70°-80° lorsqu'on y ajoute une quantité suffisante de divers sels, tels que les chlorures et sulfates alcalins ou alcalino-terreux, ou l'eau de chaux. L'addition d'acide carbonique permet la coagulation des solutions pauvres en sels. E. GRIMAU voyait dans ces phénomènes l'expression d'une analogie frappante entre son anhydride amidobenzoïque et les matières albuminoïdes. Le colloïde amidobenzoïque donne par KOH et $CuSO_4$ une solution violet-bleu, par KOH et $NiSO_4$ une solution jaune pâle, et par KOH et $CoSO_4$ un brun-pourpre qui passe rapidement au brun (J. W. PICKERING (3)).

1. E. GRIMAU. Sur les colloïdes azotés (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 38, 64, 1882) — Sur quelques substances colloïdales (*C. R. Ac. Sc.*, 98, 1434, 1884).

2. E. GRIMAU. Sur un colloïde azoté dérivé de l'acide amidobenzoïque (*C. R. Ac. Sc.*, 98, 231, 1884).

3. J. W. PICKERING. On certain proteid and albuminoid reactions and their significance (*Journ. of Physiol.*, 14, 347, 1893).

Des recherches ultérieures de J. W. PICKERING (1) ont montré que les trois colloïdes synthétiques (colloïde amidobenzoïque A, obtenu à 125°; colloïde amidobenzoïque B, obtenu à 135°; colloïde aspartique ammoniacal C) produisent, lorsqu'on les injecte, en solution de 1 à 20/0, dans les veines à des lapins, des coagulations intravasculaires tout à fait comparables à celles que déterminent les nucléoprotéïdes ou le venin des serpents. Bien plus, l'analogie remarquable du colloïde C avec les nucléoprotéïdes se poursuit si loin qu'il ne détermine pas de coagulation intravasculaire chez les lapins albinos (W. D. HALLIBURTON et J. W. PICKERING) (2), ou même chez le lièvre polaire (*Lepus variabilis*) en pelage blanc, tandis que chez cet animal en pelage d'été la coagulation est rapide (J. W. PICKERING) (3). Or, les nucléoprotéïdes se comportent exactement de la même façon; de plus, le colloïde C accélère comme eux la coagulation *in vitro* du sang additionné de carbonates alcalins.

En maintenant ces trois colloïdes à 38° pendant quatorze jours avec de la pepsine et de l'acide chlorhydrique à 2 0/0, le colloïde B ne paraît pas digestible. Le colloïde C se digère plus lentement que les fibrines, et au bout de quatorze jours la digestion est encore incomplète; mais le produit, qui donnait en violet la réaction du biuret, au bout de deux jours la donne en rose comme les peptones et les protéoses. Le colloïde A se digère encore bien plus lentement, et incomplètement: au bout d'une semaine seulement la réaction du biuret se fait en rose (J. W. PICKERING) (4).

Le colloïde C entretient tout autant que l'ovalbumine les mouvements du cœur d'embryon de rat qu'on plonge dans sa solution à 7,5 0/0; les colloïdes A et B n'entretiennent pas plus ces mouvements que si le cœur est plongé dans NaCl à 0,75 0/0 (J. W. PICKERING) (5).

En outre, J. W. PICKERING (6) prépara lui-même, à l'exemple de

1. J. W. PICKERING. Sur les colloïdes de synthèse et la coagulation (*C. R. Ac. Sc.*, 120, 1348, 1895).

2. W. D. HALLIBURTON et J. W. PICKERING. The intravascular coagulation produced by synthesised colloids (*Journ. of Physiol.*, 18, 285, 1895).

3. J. W. PICKERING. The coagulability of the blood of albinos (*Journ. of Physiol.*, 20, 310, 1896).

4. J. W. PICKERING. Sur les colloïdes de synthèse et la coagulation (*C. R. Ac. Sc.*, 120, 1348, 1895).

5. J. W. PICKERING. Experiments of the hearts of Mammalian and Chick-embryos, with special reference to action of electric currents (*Journ. of Physiol.*, 20, 165, 1896).

6. J. W. PICKERING. The Chemical and Physiological Reactions of certain Synthesised Proteid-like Substances (*Proceed. Roy. Soc.*, 60, 337, 1897).

E. GRIMAU, une série de colloïdes nouveaux en chauffant en tube scellé, à 125° ou 130°, les mélanges suivants :

Colloïde α : Acide métaamidobenzoïque (1 partie) + biuret (1 p.) + P^2O^5 (3 p.).

Colloïde β : Tyrosine (1 p.) + biuret (1 p.) + P^2O^5 (2 p.).

Colloïde γ : Alloxane (1 p.) + acide métaamidobenzoïque (1 p.) + P^2O^5 (2 p.).

Colloïde δ : Acide paraamidobenzoïque (1 p.) + PCl^5 (1 p.).

Colloïde ϵ : Tyrosine (1 p.) + xanthine (1 p.) + PCl^5 (2 p.).

Colloïde ζ : Tyrosine (1 p.) + hypoxanthine (1 p.) + PCl^5 (2 p.).

Colloïde η : Tyrosine (1 p.) + P^2O^5 (1 p.).

Ces substances, qui naturellement diffèrent entre elles par certaines propriétés, sont toutes solubles dans l'eau chaude, où elles donnent des solutions opalescentes lévogyres. Elles donnent la réaction du biuret et la réaction xanthoprotéique. En l'absence de sels, elles ne coagulent pas, mais une trace de sels neutres suffit à les faire coaguler à des températures analogues à celles où coagulent les albumines. Un excès de sels neutres les précipite, ainsi que les sels des métaux lourds. Chacune de ces substances présente le phénomène de la coagulation fractionnée, ce qui révèle son caractère complexe. Leurs propriétés physiologiques, elles aussi, rappellent celles de certains protéides.

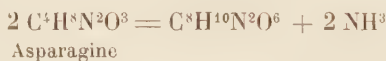
Dans un dernier travail (1), J. W. PICKERING s'est adressé enfin aux produits de désintégration du nucléoprotéide du thymus de mouton ; cette substance, chauffée en tube scellée avec du chlorure de calcium anhydre, fournit des matières cristallines donnant encore la réaction du biuret, mais ne se comportant plus comme des matières protéiques. Si maintenant on chauffe ces produits cristallins à 125° avec PCl^5 , ils se transforment partiellement en substances colloïdales ressemblant, au point de vue chimique et au point de vue physiologique, aux colloïdes de E. GRIMAU. Malheureusement l'ignorance complète de la nature des produits cristallins dont on est parti ne laisse à cette expérience qu'un intérêt limité.

La dernière condensation directe, *en apparence* du moins, que nous ayons à signaler est d'origine fortuite. En chauffant en tube scellé à 150°-170° pendant vingt-quatre heures un mélange de glycolle et de glycérine, dans l'espoir d'en obtenir la combinaison en un glycéride,

1. J. W. PICKERING. Sur de nouvelles substances colloïdales, analogues aux albuminoïdes, dérivées d'une nucléo-albumine. (*C. R. Ac. Sc.*, 125, 963, 1897).

L. BALBIANO et D. TRASCIATTI (1) ont constaté que la glycérine n'entre pas en combinaison avec l'acide aminé, mais se comporte simplement comme un agent déshydratant. Ils ont obtenu ainsi une poudre jaunâtre, insoluble dans tous les dissolvants neutres, qui charbonne au-dessus de 250° sans fondre et en dégageant une odeur de corne brûlée ; cette substance n'est pas sans analogie avec les matières cornées. Elle est facilement hydratée par HCl concentré à 100°, et redonne abondamment du glyocolle, qui est le seul produit de son hydrolyse, ainsi que l'a démontré plus tard L. BALBIANO (2). C'est un anhydride polymérisé du glyocolle, de formule $(C^2H^3NO)^n$, différent de l'anhydride bimoléculaire $(C^2H^3NO)^2$ (2.5. diacipipérazine) obtenu antérieurement par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL comme nous le verrons plus loin. L. BALBIANO a constaté, de plus, qu'une petite quantité de ce dernier anhydride $C^4H^6N^2O^2$, soluble dans l'eau chaude, se forme à côté de l'anhydride corné.

D'après L. BALBIANO et D. TRASCIATTI, la glycérine ne semble exercer dans les mêmes conditions aucune action sur l'alanine. En revanche, l'asparagine perdrait de l'ammoniaque et de l'acide carbonique, et parmi les produits de réaction les auteurs ont isolé une petite quantité d'un acide amorphe, soluble dans l'eau, dont ils interprètent ainsi la formation :



On verra dans la suite de ce travail, que mon opinion personnelle est au contraire loin de considérer la glycérine comme un simple milieu déshydratant banal quelconque, et que loin d'être inactive sur l'alanine comme l'ont cru L. BALBIANO et D. TRASCIATTI, la glycérine produit au contraire des condensations régulières dans la série des aminoacides, qu'il s'agisse du glyocolle, de l'alanine, ou de termes plus élevés.

1. L. BALBIANO u. D. TRASCIATTI. Ueber ein neues Derivat des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 33, 2323, 1900).

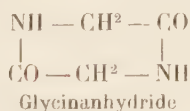
2. L. BALBIANO. Ueber ein neues Glykocollanhydrid (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 1504, 1901). — Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, 1, 410, 1902).

III. — CONDENSATION SPONTANÉE DE DÉRIVÉS DES AMINO-ACIDES : SYNTHÈSE EMPIRIQUE DE DÉRIVÉS DES POLYPEPTIDES.

Il y a près de trente ans que TH. CURTIUS (1) réussit à éthérifier le glycolle en le mettant en suspension dans l'alcool absolu, et saturant par un courant de gaz chlorhydrique sec. Il obtint ainsi le *chlorhydrate de glycinate d'éthyle* $\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOC}^2\text{H}^5$, substance très soluble dans l'eau et dans l'alcool, qui cristallise magnifiquement en aiguilles F. 144°. De la solution aqueuse concentrée du chlorhydrate, l'oxyde d'argent ajouté en quantité théorique libère le *glycinate d'éthyle* lui-même $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOC}^2\text{H}^5$, qu'on extrait par l'éther ou le chloroforme et qui, après évaporation du dissolvant, reste sous forme d'une huile incolore, d'odeur particulière rappelant le cacao, fortement basique.

Le glycinate d'éthyle ne se conserve pas : sa décomposition se fait très rapidement, à moins qu'il ne soit rigoureusement exempt de toute trace d'eau. Mais contrairement à ce qu'on pourrait croire, il ne se produit pas, même en présence de l'eau, une saponification avec régénération du glycolle et de l'alcool : au lieu de glycolle régénéré, le produit contient deux substances très intéressantes.

L'une, bien cristallisée, sublinable en aiguilles blanches, répond à la formule $(\text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO})$; elle a reçu le nom, d'abord de glycollimid-anhydride (TH. CURTIUS) (2), puis de *glycinanhydride* (TH. CURTIUS et FR. GOEBEL) (3) ; des mesures cryoscopiques ultérieures (TH. CURTIUS et H. SCHULZ) (4) ont montré que sa formule devait être doublée, comme le soupçonnait dès le début TH. CURTIUS. Le glycinanhydride, produit de décomposition spontanée du glycinate d'éthyle, a donc pour formule :



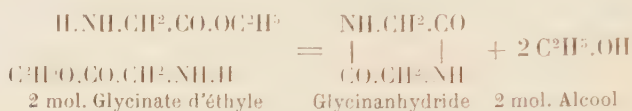
1. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol. Vorläufige Mittheilung (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883).

2. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol. Vorläufige Mittheilung (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883).

3. TH. CURTIUS et FR. GOEBEL. Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 37, 450, 1888).

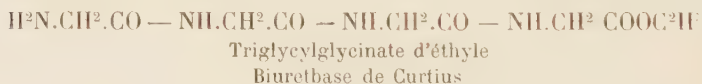
4. TH. CURTIUS u. H. SCHULZ. Moleculargrösse des Glycins und des Glycinanhydrids (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 23, 3044, 1890).

et sa formation à partir du glycinate d'éthyle peut se représenter par l'équation :



L'autre substance obtenue à côté du glycinanhydride dans la décomposition spontanée du glycinate d'éthyle, et qui se forme en proportion d'autant plus grande que les traces d'eau sont plus restreintes, est une poudre blanche, peu soluble dans l'eau froide, plus facilement à chaud, et dont la solution se caractérise par la propriété de donner la réaction du biuret, avec une magnifique teinte rose. La substance possède un caractère basique assez accentué, aussi TH. CURTIUS (1) la désigna-t-il sous le nom de *Biuretbase*, base biurétique, en attendant que sa constitution fût élucidée, ce qui devait demander plus de vingt ans. tellement est difficile le travail avec les corps de cette série, ainsi que j'ai eu amplement l'occasion de m'en apercevoir moi-même au cours des recherches qui font l'objet du présent mémoire.

Malgré les recherches de TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (2), malgré celles beaucoup plus récentes de M. SCHWARZSCHILD (3) qui avait cru pouvoir affirmer l'existence, dans la molécule de la base biurétique, de 7 groupements de glycolle et d'un groupe éthyle, ce qui en aurait fait l'éther éthylique d'un heptapeptide, c'est seulement par de nouvelles recherches de TH. CURTIUS (4) avec la collaboration de O. GRMLICH, que put être établie la constitution du corps. La base biurétique (*Biuretbase*) obtenue dans la décomposition spontanée du glycinate d'éthyle n'est pas autre chose que le *triglycylglycinate d'éthyle* :



C'est donc l'éther éthylique de la triglycylglycine, c'est-à-dire d'un

1. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol. Vorläufige Mittheilung (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883).

2. TH. CURTIUS et FR. GOEBEL. Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 37, 150, 1888).

3. M. SCHWARZSCHILD. Ueber die Wirkungsweise des Trypsins (*Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 4, 155, 1904).

4. TH. CURTIUS. Ueber die freiwillige Zersetzung des Glykocoll-ester (Ber. d. d. chem. Ges., 37, 1284, 1904).

tétrapeptide (suivant la dénomination de E. FISCHER que nous verrons tout à l'heure), autrement dit d'une molécule formée des restes de 4 molécules de glyocolle enchaînés par union des carboxyles aux aminogènes, molécule répondant par suite à la notion structurale essentielle que nous nous sommes formée des molécules albuminoïdes. La substance donne la réaction du biuret à la façon des peptones. M. SCHWARZSCHILD (1), puis E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (2), ont constaté que la trypsine du pancréas digère la base biurétique (triglycylglycinate d'éthyle) en régénérant du glyocolle.

TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (3) avaient de plus observé déjà que leurs échantillons de base biurétique (qui à vrai dire étaient impurs et renfermaient une notable proportion de glycineanhydride) éprouvaient une modification par l'ébullition prolongée dans l'eau. « Il se forme du « glycineanhydride, et à côté une substance se séparant en flocons « difficilement solubles, qui après filtration forme une gelée qui « après dessiccation à l'air se contracte comme de la gélatine, et « est amorphe. Les petits fragments desséchés jaunâtres, qui ne sont « plus qu'à peine solubles dans l'eau, se gonflent en présence de « celle-ci, et baignés de liqueur de Fehling ils se colorent en rouge- « violet ».

A son tour L. LILIENFELD (4), dans ses tentatives pour reproduire artificiellement des matières comparables aux matières albuminoïdes, prit comme point de départ la Biuretbase de TH. CURTIUS. Chauffant cette base biurétique avec de l'eau, il voit se former des flocons qui constituent une gelée lorsqu'on les recueille sur un filtre, et qui par dessiccation donnent des croûtes vitreuses, à peine solubles dans l'eau où elles se gonflent beaucoup. A cette substance colloïde, donnant la réaction du biuret, facilement soluble dans la pepsine chlorhydrique, L. LILIENFELD trouve une ressemblance frappante avec la gélatine.

Condensant ensuite le glycinate d'éthyle avec les éthers correspondants de la leucine et de la tyrosine qui furent préparés pour la première fois à cette occasion, L. LILIENFELD obtint une substance remar-

1. M. SCHWARZSCHILD. *Loc. cit.*

2. E. FISCHER u. E. ABDERHALDEN. Ueber das Verhalten verschiedenen Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft (*Z. physiol. Chem.*, 46, 52, 1905).

3. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocolläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 37, 450, 1888).

4. L. LILIENFELD. Ueber proteïnähnliche Substanzen (*Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth.*, 1894, 383). — Zur Chemie der Eiweisskörper (*Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth.*, 1894, 555).

quable, possédant toutes les propriétés des peptones. Soluble dans l'eau, précipitable par l'alcool, cette peptone synthétique possède même la saveur spéciale des peptones, elle charbonne avec l'odeur caractéristique des albuminoïdes. Elle donne la réaction du biuret en violet-rouge, la réaction xanthoprotéique, celles de Millon et d'Adamkiewicz, la réaction par le sucre et H^2SO^4 . Le tannin, l'acide picrique, le sous-acétate de plomb ammoniacal, le chlorure mercurique, l'iodomercurate de potassium, les acides phosphotungstique et phosphomolybdique la précipitent; mais elle n'est précipitée ni par l'acide nitrique ni par le ferrocyanure acétique.

Enfin, par certains procédés de condensation de la base biurétique avec les éthers de la leucine et de la tyrosine en présence d'un peu d'aldéhyde formique, L. LILIENTHAL a même réussi à obtenir un corps coagulable par la chaleur, précipitable par les acides minéraux et par le ferrocyanure acétique, se comportant en un mot tout à fait comme les matières albuminoïdes naturelles.

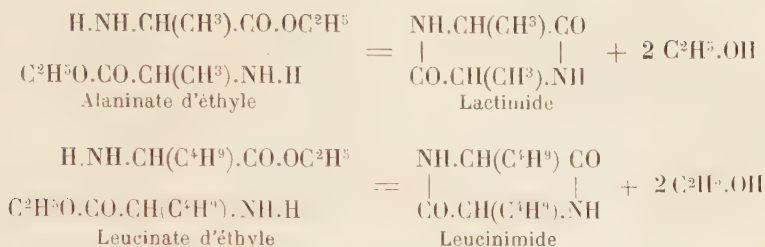
Ces condensations ont donc fait connaître à la science une série de corps biurétiques, de constitution certainement voisine de celle des albuminoïdes mais encore inconnue, sauf pour ce qui concerne la biurétase de CURTIUS (triglycylglycinate d'éthyle). Encore celle-ci n'a-t-elle été déterminée que tardivement, et postérieurement à d'autres découvertes dont nous allons dire un mot.

La décomposition du glycinate d'éthyle, avec régénération de l'alcool et formation de glycinanhydride, n'est pas un phénomène isolé: c'est au contraire une propriété générale des éthers éthyliques ou méthyliques des acides α -aminés. Le leucinate d'éthyle, par exemple, ne se condense, il est vrai, que lentement et partiellement en leucinimide à la température ordinaire (E. FISCHER) (1), plus rapidement si le flacon est mal bouché (L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN) (2), mais la condensation est plus rapide au bain-marie en présence d'éthylate de sodium (E. FISCHER) (3); et si l'on chauffe en tube scellé pendant 24 heures vers 180° l'éther éthylique de la leucine ou de l'alanine, on obtient, avec des rendements supérieurs à 60 0/0, la leucinimide ou la lactimide:

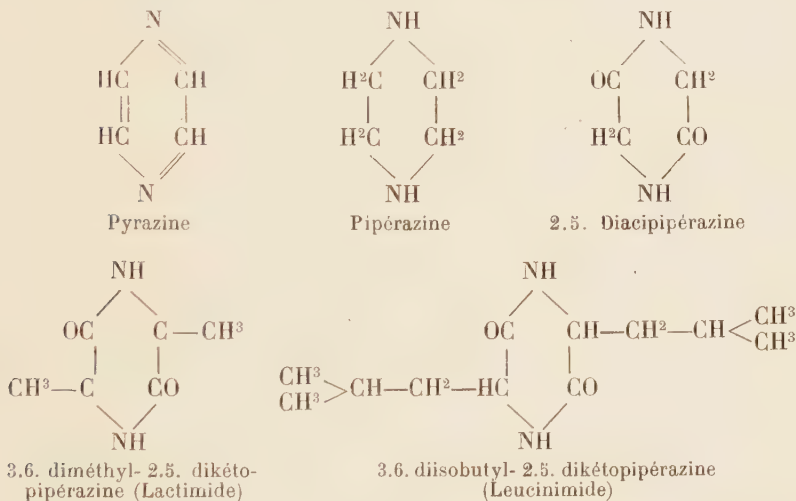
1. E. FISCHER. Ueber die Ester der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 448, 1901).

2. L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN. Nouvelle synthèse de la leucine racémique (*Bull. Soc. chim.*, 3^e s., 31, 1180, 1904).

3. E. FISCHER. *Loc. cit.*



Tous les acides aminés se comportent d'une manière analogue : leurs éthers fournissent les anhydrides doubles des aminoacides, qui sont décrits dans les œuvres de E. FISCHER (1) sous le nom de 2.5. diacipipérazines ou 2.5. dikétopipérazines. On peut en effet les rattacher théoriquement au noyau pyrazique, à la pipérazine ou hexahydropyridazine :

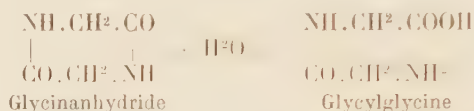


Or, en 1901, E. FISCHER et E. FOURNEAU (2) découvrirent qu'il suffit de dissoudre les cristaux de 2.5. diacipipérazine dans l'acide chlorhy-

1. E. FISCHER *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine*. Berlin, 1906. (On trouvera reproduits dans ce volume les divers mémoires, empruntés à *Ber. d. d. chem. Ges.* et à *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, qui traitent des 2.5. dikétopipérazines).

2. E. FISCHER u. E. FOURNEAU Ueber einige Derivate des Glykokolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

drique concentré et de porter à l'ébullition pendant une minute, pour ouvrir l'anneau pipérazique du glycīnanhydride. Par ce traitement ménagé, la rupture entre les deux groupements glycyliques n'est pas double, mais ces deux groupements restent encore enchaînés par l'une des deux liaisons :



La nouvelle substance est une molécule de glycine dans laquelle un hydrogène du groupe aminé est remplacé par un groupement glycylic $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} -$: c'est la *glycyl-glycine* $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH}$, premier exemple et premier terme de la série des chaînes d'acides aminés, type du groupe des *dipeptides* qui peut servir d'introduction à la famille albuminoïde. E. FISCHER (1) a trouvé plus tard que le séjour d'un quart d'heure, à froid, dans la soude normale, suffit pour ouvrir la molécule cyclique du glycīnanhydride et le transformer en glycyl-glycine.

Les 2.5, dikétopipérazines dérivées de l'alanine, de la leucine, et en général des divers acides aminés peuvent être ouvertes avec plus ou moins de facilité suivant l'espèce : E. FISCHER (2) a constaté que la leucinimide exige l'action de HBr fumant pour se transformer en leucyl-leucine. Le phénomène de condensation spontanée des éthers permet en somme d'obtenir des dipeptides en chaîne ouverte tels que la *glycyl-glycine*, l'*alanyl-alanine*, la *leucyl-leucine*, etc. Mais jusqu'à présent ces condensations spontanées d'éthers ont fourni seulement des dikétopipérazines homogènes, où les deux substitutions sont les mêmes, et qui par leur ouverture ne fournissent que des dipeptides où les deux articles appartiennent à la même espèce d'acide aminé. Enfin et surtout, la chaîne construite de cette façon ne contient que 2 molécules d'acide aminé, c'est-à-dire que l'édifice architectural s'arrête, à peine commencé.

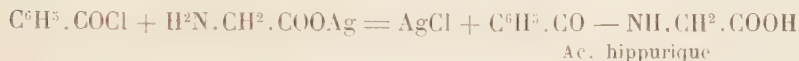
Les chaînes plus longues d'acides aminés n'ont été obtenues d'abord que sous la forme de *dérivés* des polypeptides, et non pas de polypeptides libres, c'est-à-dire qu'une extrémité de la chaîne était toujours surchargée d'un groupe étranger substituant, dont on n'arrivait pas à

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 605, 1905).

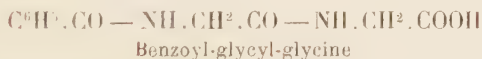
2. E. FISCHER. Ueber einige Derivate des Glykocolls, Alanins und Leucins (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 35, 1095, 1902).

débarrasser la chaîne sans la disloquer elle-même de fond en comble. Nous avons déjà vu un dérivé de polypeptide qui était un éther, le tri-glycylglycinate d'éthyle (Biuretbase de CURTIUS). Les chaînes *acylées* à l'azote sont connues depuis plus longtemps encore, antérieurement au glycinanhydride lui-même.

Il y a près de soixante ans que V. DESSAIGNES (1) avait réalisé la synthèse de l'acide hippurique (benzoylglycine) par le chlorure de benzoyle et le glycocollate d'argent :



Cette réaction est complexe en ce sens déjà que, si l'argent est bien fixé au carboxyle (ce qui d'ailleurs n'est pas prouvé), le groupe benzoyle ne se fixerait pas à la place qu'occupait le métal, et la réaction comporterait une transposition moléculaire. Mais de plus, TH. CURTIUS (2) découvrit en 1881 qu'il se produit alors des substances multiples : il réussit à isoler trois acides. Le premier (α) est bien l'acide hippurique (benzoylglycine), mais le second (β), de poids moléculaire plus élevé $\text{C}^{14}\text{H}^{12}\text{N}^3\text{O}^4$, a été reconnu dès cette époque par TH. CURTIUS comme *acide hippurylamidoacétique*, que nous appellerions aujourd'hui *benzoyl-glycyl-glycine* :



car l'hydrolyse scindait le corps d'abord en une molécule de glycocolle et une molécule d'acide hippurique, laquelle fournissait à son tour une deuxième molécule de glycocolle et de l'acide benzoïque. Quant au troisième acide (γ), auquel TH. CURTIUS avait cru reconnaître la formule empirique $\text{C}^{10}\text{H}^{12}\text{N}^3\text{O}^4$, il attirait particulièrement l'attention par sa propriété de donner une magnifique réaction du biuret, à la façon des peptones. Il fournissait encore, parmi ses produits de décomposition, du glycocolle et de l'acide benzoïque, mais TH. CURTIUS ne put arriver à déterminer alors sa constitution.

1. V. DESSAIGNES. Régénération de l'acide hippurique (*C. R. Ac. Sc.*, 37, 251, 1853).

2. TH. CURTIUS. Ueber die Einwirkung von Chlorbenzoyl auf Glycocolsilber. Vorl. Mitth. (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 24, 239, 1881). — Ueber einige neue der Hippursäure analog konstituierte synthetisch dargestellte Amidosauren (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 26, 143, 1882). — Ueber die Einwirkung von Benzoylchlorid auf Glycinsilber (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 26, 467, 1882).

Bientôt après, TH. CURTIUS (1) remarqua que pour obtenir l'acide γ il est plus avantageux, au lieu de faire réagir le chlorure de benzoyle sur le glycollate d'argent, de fondre le glycolle libre avec l'hippurate d'éthyle (vers 180°) : on recueille ainsi des quantités relativement considérables d'acide γ . Il ne paraît pas se former ici d'acide hippuryl-amidoacétique (benzoylglycine) ; en revanche TH. CURTIUS a isolé de petites quantités d'un acide bien caractérisé de formule $C^{13}H^{15}N^3O^5 + H^2O$, qui perd son eau de cristallisation à 110°, et donne un sel d'argent $C^{13}H^{14}N^3O^5.Ag$. L'auteur interprète ce corps comme un *acide benzoyl-diamidoacétylamidoacétique* (nous dirions aujourd'hui *benzoyl-diglycyl-glycine*) :



qui, dit TH. CURTIUS, « a les mêmes relations vis-à-vis de l'hippuryl-glycolle, que celui-ci vis-à-vis de l'acide hippurique ».

TH. CURTIUS avait donc parfaitement saisi, dès cette époque, le phénomène de l'enchaînement successif des molécules de glycolle sur une souche de benzoyle (ou d'acétyle comme nous allons le voir), et l'exprimait (2) dans les termes les plus explicites : « A partir du chlorure de benzoyle et du glycinate d'argent, dit-il, il ne devrait se former que de l'acide hippurique ; mais à côté de celui-ci, il se forme une série d'acides dans laquelle chaque membre successif renferme, de plus que le précédent, un glycolle moins H^2O , soit $NH.CH^2.CO$ » (3).

L'enchaînement progressif des molécules de glycolle ne se fait d'ailleurs pas seulement sur une souche initiale constituée par le groupe benzoyle. Un autre groupement acylé, le groupe acétyle, peut jouer le même rôle. C'est ainsi que TH. CURTIUS, en condensant le chlorure d'acétyle avec le glycollate d'argent, obtient, non seulement de l'acétylglycolle (acide acéturique) $CH^3.CO-NH.CH^2.COOH$, mais encore un produit de condensation plus élevé, tout à fait comparable à l'acide benzoylé γ par ses propriétés physiques et chimiques, et qui donne comme lui la réaction du biuret (4). Ce produit acétylé biurétique

1. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol. Vorl. Mitth. (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883)

2. TH. CURTIUS. Ueber Acetursäure (Acetylgylin) (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 17, 1663, 1884).

3. « Aus Chlorbenzoyl und Glycinsilber sollte nur Hippursäure entstehen ; neben derselben bildet sich aber eine Reihe von Säuren, in welcher jedes folgende Glied ein Glycocol — $H^2O = NHCH^2CO$, mehr enthält als das vorhergehende. » (*Ber. d. d. chem. Ges.*, t. 17, p. 1666, ligne 3).

4. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol. Vorl. Mitth. (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883).

s'obtient d'ailleurs plus facilement encore, à l'exemple du benzoylé, quand on fond le glycocolle libre avec l'éther acéturique (acétylglycinate d'éthyle) (1).

C'est seulement une vingtaine d'années plus tard que la constitution de l'acide γ de TH. CURTIUS put être établie, grâce à sa comparaison avec les différents termes d'une série méthodique de benzoylglycylglycines successivement condensées par TH. CURTIUS (2) et R. WÜSTENFELD (3) à l'aide de la méthode des azides que nous verrons tout à l'heure. Reprenant l'étude de l'acide γ , TH. CURTIUS et A. BENRATH (4) l'ont préparé en chauffant, à 190° , 21 gr. d'hippurate d'éthyle avec 20 gr. de glycocolle, et agitant le mélange jusqu'à solidification. La masse refroidie et pulvérisée est bouillie avec 1 litre d'eau et du noir animal, jusqu'à décoloration : on filtre chaud, et par refroidissement se sépare une bouillie cristalline qui est recueillie, lavée à l'eau, recristallisée dans l'eau bouillante, séchée à 110° . La substance fond vers 285° , et répond à la formule $C^{19}H^{24}N^6O^8$. L'acide γ est donc l'acide benzoylpentaglycylamidoacétique (*benzoyl-pentaglycyl-glycine*) :



TH. CURTIUS et A. BENRATH l'ont converti en sel d'argent et en éther éthylique; ils ont de plus constaté son identité complète avec la benzoyl-pentaglycyl-glycine de constitution méthodiquement établie par la voie graduelle des azides (5). Aucun doute ne saurait donc plus subsister sur la constitution de l'acide γ .

La concentration des eaux-mères de l'acide γ a encore fourni à

1. TH. CURTIUS, Ueber Acetursäure (Acetylglycin) (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 17, 1663, 1884).

2. TH. CURTIUS, Synthetische Versuche mit Hippurazid (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 35, 3226, 1902). -- Verkettung von Amidosäuren. I Abhandlung (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 57, 1904).

3. R. WÜSTENFELD, Ueber die Bildung von Glycylketten mittels Säureaziden (*Diss.*, Heidelberg, K. Rössler, 1903). -- TH. CURTIUS u. R. WÜSTENFELD, Verkettung von Amidosäuren. II Abhandlung. Ueber die Bildung von Glycylketten mit Hippurazid (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 73, 1904).

4. TH. CURTIUS u. A. BENRATH, Ueber Benzoyl-pentaglycyl-amidoessigsäure (γ Säure) (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1279, 1904).

5. R. WÜSTENFELD, Ueber die Bildung von Glycylketten mittels Säureaziden (*Diss.*, Heidelberg, K. Rössler, 1903). -- TH. CURTIUS u. L. LEVY, Verkettung von Amidosäuren. III Abhandlung. Weitere Untersuchungen über die Bildung von Glycylketten mit Hippurazid (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 89, 1904).

TH. CURTIUS et A. BENRATH (1) l'acide benzoyltriglycylamidoacétique (*benzoyl-triglycyl-glycine*) :



identique en toutes ses propriétés à celui que R. WÜSTENFELD (2) avait construit méthodiquement par la méthode des azides. Enfin les eaux-mères de l'acide benzoyltriglycylamidoacétique fournissaient encore, outre de l'hippurate d'éthyle inaltéré, de l'acide hippurylamidoacétique (*benzoyl-glycyl-glycine*) :



Il est donc définitivement établi par les travaux de TH. CURTIUS et de ses élèves, que la condensation du chlorure de benzoyle avec le glycinate d'argent, ou mieux du benzoylglycinate d'éthyle avec le glycolle, fournit une *série de chaînes* où les molécules de glycine s'accumulent sur le radical acylé, et cela *jusqu'au nombre maximum de six molécules d'acide*. Voici le tableau de ces substances, où j'ai mis entre parenthèses les termes qui n'ont été rencontrés qu'en certaines circonstances et sans qu'on puisse affirmer leur formation constante :

Benzoylglycine	$\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{COOH}$
Benzoylglycylglycine	$\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{COOH}$
(Benzoyldiglycylglycine)	$\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO} - (\text{NH}.\text{CH}_2.\text{CO})^2 - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{COOH}$
Benzoyltriglycylglycine	$\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO} - (\text{NH}.\text{CH}_2.\text{CO})^3 - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{COOH}$
(Benzoyltétraglycylglycine)	$\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO} - (\text{NH}.\text{CH}_2.\text{CO})^4 - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{COOH}$
Benzoylpentaglycylglycine	$\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO} - (\text{NH}.\text{CH}_2.\text{CO})^5 - \text{NH}.\text{CH}_2.\text{COOH}$

Je ferai personnellement remarquer que, pour ce qui concerne les termes contenant un nombre impair de molécules glycyliques (3 et 5), quelques réserves sont à faire sur leur authenticité ; tandis que pour les *chaînes à nombre pair de glycyliques* (2, 4, 6), leur authenticité est incontestable. Nous comparerons dans la suite cette notion avec celles que j'ai moi-même acquises par mes recherches personnelles.

Remarquons enfin que, de l'aveu même de ses auteurs (3), l'étude expérimentale de ces corps est très pénible, car « il y a une difficulté

1. TH. CURTIUS u. A. BENRATH. Ueber Benzoyl-pentaglycyl-amidoessigsäure (γ Säure) (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1279, 1904).

2. R. WÜSTENFELD. Ueber die Bildung von Glycyllketten mittels Säureaziden (*Diss.*, Heidelberg, K. Rössler, 1903)

3. TH. CURTIUS u. A. BENRATH. Ueber Benzoyl-pentaglycyl-amidoessigsäure (γ Säure) (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1279, 1904).

peu commune à obtenir l'acide γ libre de tout mélange avec les « homologues » inférieurs » (1). J'ai appris à mes dépens, en des circonstances sinon identiques, du moins comparables, tout le bien fondé d'une telle constatation.

Enfin pour ce qui concerne les produits *acétylés*, supérieurs et biurétiques, qui se forment lorsqu'on condense le chlorure d'acétyle avec le glycocollate d'argent, ou mieux l'acétylglycinate d'éthyle avec le glycocolle, les manipulations sont si difficiles qu'il a été totalement impossible jusqu'ici (2) d'isoler à l'état de pureté un terme défini quelconque.

Dans le même groupe de condensations, on peut encore classer un cas où intervient à la fois l'éthérification du carboxyle, comme dans la base biurétique de TH. CURTIUS, et la substitution de l'aminogène par un groupe acylé, comme dans les acides benzoylés du même auteur.

Parmi les dérivés de la glycyglycine obtenus dès 1904 par E. FISCHER et E. FOURNEAU (3) figurait l'*éther carboxéthylglycyglycique*; sans être obligé d'isoler d'abord la glycyglycine, on peut mettre la 2.5. diacipipérazine en suspension dans l'alcool, saturer de HCl gazeux, et chauffer un instant : on obtient le chlorhydrate du glycyglycinate d'éthyle. L'action du chlorocarbonate d'éthyle sur le chlorhydrate de glycyglycinate d'éthyle, en présence de Na^2CO^3 , fournit directement le *carboxéthylglycyglycinate d'éthyle* :



Or cet éther carboxéthylglycyglycique, maintenu pendant longtemps à 130° avec le leucinate d'éthyle, soude sa chaîne au groupe amino de celui-ci, et l'on obtient un corps formé par enchaînement de trois molécules d'acides, le *carboxéthylglycyglycylleucinate d'éthyle* :



Mais ce nouvel éther, bien que renforcé à l'azote par un groupement carbéthoxyle, ne se prête plus à des condensations ultérieures, et l'on ne peut allonger la chaîne par le même procédé.

1. « Es ist allerdings ungemein schwierig, diese γ -Säure ganz frei von Beimengungen der niederen « Homologen », namentlich der Benzoyltetraglycyramidooessigsäure zu erhalten ». (*Ber. d. d. chem. Ges.*, t. 37, p. 1280).

2. TH. CURTIUS u. A. BENRATH. Ueber Benzoyl-pentaglycyl-amidoessigsäure (γ -Säure) (*Ber. d. d. chem., Ges.*, 37, 1279, 1904).

3. E. FISCHER u. E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glykokolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

IV. — CONDENSATION MÉTHODIQUE DE DÉRIVÉS DES AMINOACIDES : SYNTHÈSE GRADUELLE DE DÉRIVÉS DES POLYPEPTIDES

Dans les pages qui précèdent, j'ai tenu à rappeler l'attention sur la synthèse spontanée et en quelque sorte empirique de certains dérivés polyglycyliques, condensations qu'il serait extrêmement regrettable de laisser tomber dans l'oubli, non seulement à cause du bel effort que représente leur étude, de la part de TH. CURTIUS et de ses élèves, mais surtout pour une raison d'ordre purement scientifique. *C'est en effet dans la voie des condensations spontanées, bien plutôt que dans celle des synthèses artificielles par échelons, qu'il importe à mon avis d'orienter les recherches*, tout au moins si l'on veut en tirer des enseignements utiles pour l'interprétation des phénomènes de la vie, qui sont caractérisés précisément par leur automatisme.

Mais il est bien certain qu'au point de vue des démonstrations constitutionnelles, une importance toute particulière appartient aux synthèses progressives par échelons, qu'il nous reste à examiner maintenant. Elles ont fourni d'abord, non des polypeptides libres, mais des dérivés acylés d'une chaîne dont les articles successifs pouvaient être soudés par deux méthodes parallèles, celle des chlorures ou celle des azides. L'une et l'autre, ces méthodes ne peuvent être appliquées, répétées-le, qu'après stabilisation, au moyen d'une substitution acylée, de l'extrémité aminée du premier article.

Depuis longtemps TH. CURTIUS s'était efforcé de préparer le chlorure d'hippuryle (chlorure de benzoylglycine) $C^6H^5.CO - NH.CH^2.CO.Cl$, dans l'espoir de le faire réagir sur le glycocollate d'argent, et d'obtenir ainsi la benzoylglycylglycine, de même que la réaction du chlorure de benzyle sur le glycocollate d'argent fournit la benzoylglycine. Malheureusement ses tentatives (1) pour préparer le chlorure d'hippuryle échouèrent.

Cependant les recherches de TH. CURTIUS l'avaient amené à découvrir les azides des acides carboxylés, et à remarquer leur grande analogie avec les chlorures d'acides sous certains rapports. Il pensa que peut-être les azides lui permettraient certaines synthèses qu'il n'avait

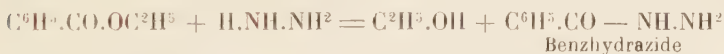
1. TH. CURTIUS. Ueber die Einwirkung von Benzoylchlorid auf Glycinsilber (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 26, 167, 1882).

pu réaliser par la voie des chlorures, faute précisément de savoir préparer les chlorures d'acides aminés. J. BAUM (1) avait appliqué aux acides aminés, en 1885, le procédé de benzylation de SCHOTTEN, et obtenu l'acide hippurique en agitant le chlorure de benzoyle avec une solution alcaline de glycocole. Remplaçant le chlorure de benzoyle par la benzazide, TH. CURTIUS (2) aidé de ses élèves R.-R. HALLAWAY (3) et E. DARMSTAEDTER (4), obtint par le même procédé, et avec d'excellents rendements, l'acide hippurique. La voie était ouverte et la méthode des azides allait se développer régulièrement.

Enfin, en 1903, E. FISCHER (5), appliquant aux acides aminés le procédé au chlorure de thionyle de A. BÉHAL et V. AUGER (6), préparait enfin les chlorures d'acides aminés vainement cherchés par TH. CURTIUS. Une voie parallèle s'ouvrait pour la synthèse des dérivés des polypeptides : ce sont ces deux méthodes, celle des azides et celle des chlorures, dont nous allons exposer les résultats.

Méthode des azides. — Il suffit de prendre ici comme exemple l'enchaînement des molécules de glycocole, celui des autres aminoacides devant se faire par un processus tout à fait identique.

On sait que l'action de l'hydrazine sur le benzoate d'éthyle donne lieu à la production de la *benzhydrazide* :



et que la benzhydrazide, traitée à froid par le nitrite de sodium en milieu acide, se transforme en *benzazide* :

1. J. BAUM. Eine einfache Methode zur künstlichen Darstellung von Hippursäure und ähnlich zusammengesetzten Verbindungen (*Z. physiol. Chem.*, 9, 465, 1895).

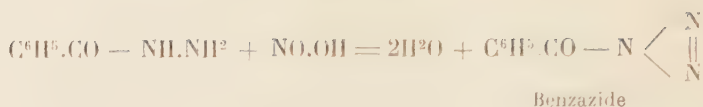
2. Voir pour cet historique : TH. CURTIUS. Verkettung von Amidosäuren. I. Abhandlung (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 57, 1904).

3. R. R. HALLAWAY. *Ueber das Hydrazid und Azid der m-Nitrohippursäure*. Inaug. Diss., Heidelberg, 1901 (Experimentell abgeschlossen, August 1899).

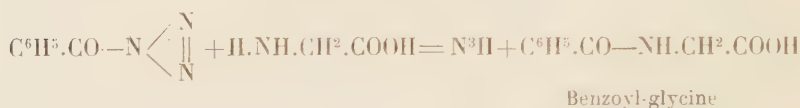
4. E. DARMSTAEDTER. *Ueber das Hydrazid der n-Tetramethylenlikarbonsäure (Adipinsäure)*. Inaug. Diss., Heidelberg, 1902.

5. E. FISCHER. Synthese von Derivaten der Polypeptide (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2094, 1903).

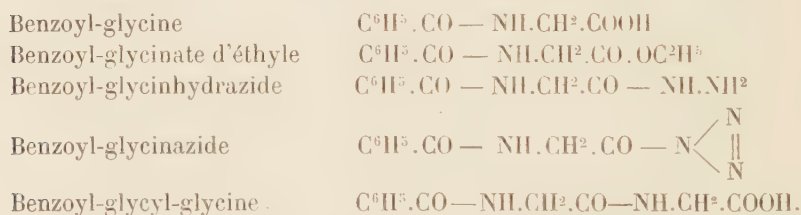
6. A. BÉHAL et V. AUGER. [Préparation du chlorure de malonyle par action du chlorure de thionyle sur l'acide malonique] (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 50, 594, 1888).



Or, R.-R. HALLAWAY découvrit en 1899, dans le laboratoire de TH. CURTIUS, que cette benzazide, agitée avec du glyocolle en solution alcaline, fournit directement l'acide hippurique ou *benzoyl-glycine*, en régénérant de l'acide azothydrique :



A son tour l'acide hippurique, éthérifié par un moyen approprié, par exemple par le passage d'un courant de HCl dans sa solution alcoolique, est transformé en hydrazide, puis en azide, qui réagit en milieu alcalin avec une nouvelle molécule de glyocolle pour donner la *benzoyl-glycyl-glycine* :



Par l'intermédiaire de son éther, de son hydrazide et de son azide, puis par réaction de celle-ci sur une troisième molécule de glyocolle, la benzoyl-glycyl-glycine sera transformée en *benzoyl-diglycyl-glycine*.

TH. CURTIUS et R. WÜSTENFELD (1) ont réussi à s'élever ainsi graduellement jusqu'à la *benzoyl-pentaglycyl-glycine*. Toutes les substances de cette série sont des corps bien cristallisés, dont les points de fusion s'échelonnent entre 200° et 270°.

On peut même aller plus vite, en remplaçant le glyocolle par la glycylglycine préparée suivant E. FISCHER et E. FOURNEAU : on fixe

1. TH. CURTIUS, Synthetische Versuche mit Hippurazid (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 35, 3226, 1902). — R. WÜSTENFELD *Ueber die Bildung von Glycylketten mittels Säureaziden*. Diss., Heidelberg, 1903. — TH. CURTIUS u. R. WÜSTENFELD, Verkettung von Amidosauren. II Abhandlung. Ueber die Bildung von Glycylketten mit Hippurazid (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 73, 1904).

ainsi d'un seul coup deux chaînons de glycyle. TH. CURTIUS et L. LEVY (1) sont parvenus jusqu'à la *benzoyl-heraglycyl-glycine* :



qui est un heptapeptide benzoylé.

Si l'hippurazide est traitée, non plus par le glycocolle, mais par l'alanine, on obtient la *benzoyl-glycyl-alanine* ; TH. CURTIUS et E. LAMBOTTE (2) ont pu préparer successivement la *benzoyl-glycyl-alanyl-alanine* et la *benzoyl-glycyl-alanyl-alanyl-alanine* (tétrapeptide benzoylé).

Il n'est pas nécessaire d'avoir un chaînon de glycyle : en prenant pour point de départ, non plus l'hippurazide, mais la benzazide elle-même, TH. CURTIUS et C.-F. van der LINDEN (3) ont préparé la *benzoyl-alanine*, puis la *benzoyl-alanyl-alanine*, de même que la *benzoyl-alanyl-glycine* et la *benzoyl-alanyl-glycyl-glycine*. TH. CURTIUS et E. MÜLLER (4) ont obtenu la *benzoyl-glycyl-phénylalanine*. Enfin l'action de l'hippurazide sur l'acide aspartique a fourni à TH. CURTIUS et H. CURTIUS (5) les très intéressants acides *benzoyl-glycyl-aspartique* et *benzoyl-glycyl-aspartyl-aspartique*.

TH. CURTIUS n'a d'ailleurs pas borné ses tentatives aux acides aminés en position α : en collaboration avec O. GÜMLICH (6) il obtint les acides *benzoyl-glycyl- β .aminobutyrique* et *benzoyl-glycyl- β .aminobutyryl- β .aminobutyrique* ; et avec l'aide de E. MÜLLER (7) il prépara l'acide *benzoyl-glycyl- γ .aminobutyrique*.

Enfin les essais pour obtenir des chaînes de carbamyles, où le reste

1. TH. CURTIUS u. L. LEVY. Verkettung von Amidosäuren. III Abhandlung. Weitere Untersuchungen über die Bildung von Glycyketten mit Hippurazid (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 89, 1904).

2. TH. CURTIUS u. E. LAMBOTTE. Verkettung von Amidosäuren. IV Abhandlung. Ueber die Einwirkung von Hippurazid auf α -Alanin (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 109, 1904).

3. TH. CURTIUS u. C. F. van der LINDEN. Verkettung von Amidosäuren. V Abhandlung. Verkettung von α -Alanin und Glycin durch Benzoylalaninazid (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 137, 1904).

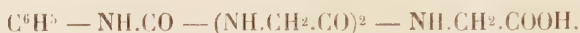
4. TH. CURTIUS u. E. MÜLLER. Verkettung von Amidosäuren. VIII Abhandlung. Ueber Hippuryl- γ .aminobuttersäure und Hippuryl- β .phenyl- α .alanin (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 223, 1904).

5. TH. CURTIUS u. H. CURTIUS. Verkettung von Amidosäuren. VI Abhandlung. Ueber die Bildung von Asparaginsäureketten mit Hippurazid (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 158, 1904).

6. TH. CURTIUS u. O. GÜMLICH. Verkettung von Amidosäuren. VII Abhandlung. Kettenbildung zwischen Hippurazid und β .amino- α .oxypropionsäure und β .aminobuttersäure (*Journ. f. prakt. Chem.*, 70, 195, 1904).

7. TH. CURTIUS u. E. MÜLLER. *Loc. cit.*

carbamique ($-\text{NH.CO}-$) jouerait le même rôle que le reste glyceique ($-\text{NH.CH}^2.\text{CO}-$), ont échoué jusqu'à présent: TH. CURTIUS a pu préparer seulement, avec la collaboration de W. LENHARD (1), la *phénylcarbamine-glycine*, la *phénylcarbamine-glycyl-glycine* et la *phénylcarbamine-diglycyl-glycine*.



Méthode des chlorures. — C'est en 1903 que E. FISCHER (2) appliqua aux acides aminés la méthode de chloruration par le chlorure de thionyle SOCl_2 , après consolidation du groupe aminé par le carboxéthyle, le radical de l'acide β .naphtalènesulfonique, ou encore le benzoyle.

Si l'on traite par le chlorure de thionyle la *carbéthoxyl-glycyl-glycine* :



obtenue par l'action du chlorocarbonate d'éthyle sur la glycylglycine, on obtient le chlorure correspondant :



Celui-ci se combine facilement, en milieu alcalin, avec les éthers des acides aminés, et on obtient par exemple l'éther de la *carbéthoxyl-diglycyl-glycine* :



En répétant le même processus, E. FISCHER obtient l'éther de la *carbéthoxyl triglycyl-glycine* ; on peut saponifier ces éthers, avec quelques précautions. En remplaçant l'éther du glycolle par ceux de l'alanine, de la leucine racémique, et de la tyrosine, on arrive à la *carbéthoxyl-glycyl-alanine* (E. FISCHER et E. OTTO (3), à la *carbéthoxyl-glycyl-d.l.leucine* et à la *carbéthoxyl-glycyl-tyrosine* (E. FISCHER et P. BERGELL (4).

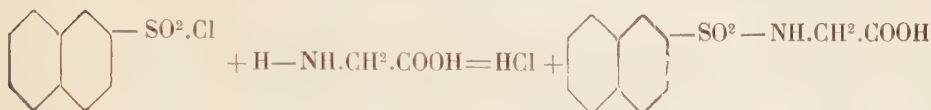
1. TH. CURTIUS u. W. LENHARD, Verkettung von Amidosauren IX Abhandlung Ueber das Verhalten der Säureazide zu Harnstoff und über die Einwirkung von Phenylcarbaminsäureazid auf Glykokoll (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 70, 230, 1904).

2. E. FISCHER, Synthese von Derivaten der Polypeptide (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2094, 1903).

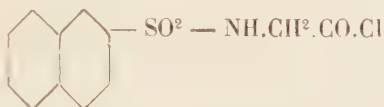
3. E. FISCHER u. E. OTTO, Synthese von Derivaten einiger Dipeptide (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2106, 1903).

4. E. FISCHER u. P. BERGELL, Ueber die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2592, 1903).

Sur ces entrefaites, E. FISCHER et P. BERGELL (1) avaient trouvé que le chlorure de l'acide β -naphthalènesulfonique réagit sur les acides aminés en solution alcaline :



On obtient ainsi la β -naphthalènesulfo-glycine, où le groupe azoté est consolidé par une substitution acide comme dans l'acide hippurique. Le chlorure de thionyle transforme à son tour cette substance en le chlorure correspondant :



qu'il est facile de fixer sur l'azote des divers aminoéthers. L'éther dipeptique obtenu est saponifié, l'acide est traité par le chlorure de thionyle, puis par les aminoéthers, et ainsi de suite. C'est de cette façon que furent obtenues la β -naphthalènesulfo-glycyl-d.alanine, la β -naphthalènesulfo-d.alanyl-glycine, la β -naphthalènesulfo-glycyl-tyrosine et la β -naphthalènesulfo-glycyl-d.l.leucine (2). Quant à la tyrosine, elle fixe par son oxhydre un deuxième groupe β -naphthalènesulfo, de telle sorte qu'on arrive à la di- β -naphthalènesulfo-tyrosyl-d.l.leucine.

Enfin, toujours grâce au chlorure de thionyle, E. FISCHER a pu préparer le chlorure d'hippuryle, qui avait échappé aux tentatives de TH. CURTIUS, et obtenir par la voie des chlorures (3) ce même éther benzoyl-diglycyl-glycique que TH. CURTIUS préparait par la voie des azides.

Par la méthode des chlorures comme par celle des azides, il est donc possible de réunir, dans une même chaîne ouverte, un nombre théoriquement indéfini de molécules d'aminoacides, de même espèce ou d'espèces différentes : en fait on a réalisé l'enchaînement de 7 molécules d'acide aminé. Malheureusement les méthodes que nous venons de

1. E. FISCHER u. P. BERGELL. Ueber die β -Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 35, 3779, 1902).

2. E. FISCHER u. P. BERGELL. Ueber die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2592, 1903).

3. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 605, 1905).

décrire ne peuvent s'appliquer qu'à une chaîne consolidée dès l'origine par la soudure à l'aminogène initial, d'un groupe acylé : benzoyle, carboxéthyl, β .naphtalènesulfo. On n'a pas jusqu'ici trouvé le moyen de débarrasser la chaîne de cet accessoire encombrant ; chaque fois que TH. CURTIUS ou E. FISCHER ont essayé de saponifier ce groupe, c'est au contraire par l'autre extrémité qu'a commencé la rupture, les molécules d'acides aminés se détachant une à une pour aboutir par exemple à l'acide hippurique, puis à l'acide benzoïque.

Ces méthodes, d'un intérêt théorique puissant, n'ont donc pu mettre aux mains des chimistes les véritables polypeptides.

V. — SYNTHÈSE DES POLYPEPTIDES LIBRES

La synthèse des polypeptides libres eux-mêmes commence avec les travaux de E. FISCHER et E. FOURNEAU (1) sur la rupture des cycles diacétylpyraziques (2), mais elle se borne alors, comme on l'a vu, aux dipeptides homogènes.

En revanche, E. FISCHER (3) a réalisé en 1903, par une voie très ingénieuse, la synthèse systématique et théoriquement indéfinie des polypeptides. Jusqu'alors, si l'on avait en mains une chaîne comportant n molécules d'acides aminés, c'est du côté du carboxyle que l'on cherchait à souder la $(n + 1)^{\text{ème}}$, de telle sorte que la chaîne s'accroissait dans le sens de la flèche et des numéros ci-dessous :



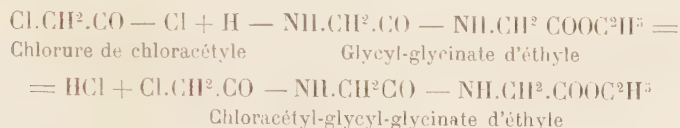
Au contraire, E. FISCHER réalise l'addition successive des molécules

1. E. FISCHER u. E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glykokolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

2. Dans ses recherches ultérieures, E. FISCHER [Synthese von Polypeptiden. IX Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 605, 1905)] a trouvé qu'il suffit d'agiter pendant un quart d'heure à froid le glycineanhydride avec de la soude normale pour le transformer en glycylglycine. L'anhydride d'alanine s'ouvre avec la même facilité ; en revanche la leucinimide est beaucoup plus résistante.

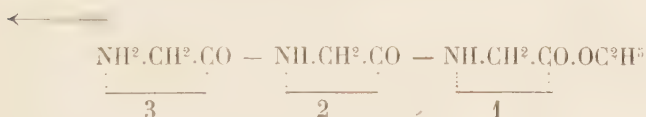
3. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2982, 1903).

nouvelles du côté du groupe aminogène. L'éther glycyglycique, par exemple, simplement mêlé au chlorure d'un acide halogéné, s'y combine (1) :



Il suffit de chauffer le produit avec l'ammoniaque aqueuse concentrée, pour remplacer par NH^2 l'halogène terminal et obtenir l'éther de la diglycyl-glycine (2). On saponifie cet éther si l'on veut arrêter ici la synthèse, ou bien on le traite à nouveau par le chlorure de chloracétyle puis l'ammoniaque pour obtenir le tétrapeptide, et ainsi de suite.

Dans cette méthode, comme on le voit, l'accroissement de la molécule se fait dans le sens inverse du précédent :



On emploie, tantôt les acides α -chlorés, tantôt et de préférence les acides α -bromés, suivant les conditions pratiques de la réaction ; et l'on choisit tout naturellement l'acide convenable suivant qu'on veut souder un groupe glycyle, leucyle, phénylalanyle, prolyle, etc. S'agit-il, par exemple, de souder un groupe leucyle, on aura recours au bromure d' α -bromoisocaproyle, etc.

Nous ne saurions entrer ici dans le détail de la riche série de synthèses exécutées d'après ce principe, depuis 1903, par E. FISCHER et ses nombreux collaborateurs. Voici seulement, à titre d'indication, un tableau des premiers polypeptides, ceux dont la synthèse était obtenue dès 1906, et qui figurent dans un ouvrage d'ensemble imprimé à cette époque par E. FISCHER (3), qui y a rassemblé les nombreux mémoires déjà publiés par lui-même ou ses collaborateurs, en même temps qu'une

1. E. FISCHER et E. OTTO. Synthese von Derivaten einiger Dipeptide (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2106, 1903).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2982, 1903).

3. E. FISCHER. *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine*. Berlin, 1906.

conférence explicative donnée par lui (1) à la Deutsche chemische Gesellschaft.

DIPEPTIDES

Glycyl-glycine.

Glycyl-d.l.alanine.

Glycyl-d.alanine.

d.l.alanyl-glycine.

d.alanyl-glycine.

l.alanyl-glycine.

Alanyl-alanine (inact.).

d.alanyl-d.alanine.

α .aminobutyryl-glycine.

Acide α .aminobutyryl- α .aminobutyrique	A }
»	B }

Glycyl-d.l.leucine.

d.l.leucyl-glycine.

Alanyl-leucine	A }
»	B }

Leucyl-alanine.

Leucyl-isosérine	A }
»	B }

Leucyl-leucine.

Phénylglycyl-glycine.

Phénylglycyl-alanine	A }
»	B }

Glycyl-phénylalanine.

Alanyl-phénylalanine.

Leucyl-phénylalanine	A }
»	B }

Phénylalanyl-glycine.

Phénylalanyl-phénylalanine.

Glycyl-l.tyrosine.

Leucyl-l.tyrosine.

Séryl-sérine.

Isoséryl-isosérine.

Glycyl-asparagine.

1. E. FISCHER. Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. Vortrag, gehalten in der Deutschen chemischen Gesellschaft am 6 Januar 1903 (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 530, 1906).

Leucyl-asparagine.
 Phénylglycyl-asparagine.
 Acide leucyl-aspartique
 Asparagyl-monoglycine.
 d.l.prolyl-alanine.
 Leucyl-proline (inact.).
 Dipeptide de l'ac. diaminopropionique.
 Lysyl-lysine.
 Histidyl-histidine.

TRIPEPTIDES

Diglycyl-glycine.
 d.l.alanyl-glycyl-glycine.
 Dialanyl-alanine.
 d.l.leucyl-glycyl-alanine.
 Leucyl-alanyl-alanine A {
 » B {
 Glycyl leucyl-alanine.
 Alanyl-leucyl-glycine.
 Leucyl-alanyl-glycine A {
 » B {
 d.l.phénylalanyl-glycyl-glycine.
 Diglycyl-phénylalanine.
 Leucyl-glycyl-phénylalanine.
 Dileucyl-phénylalanine.
 Asparagyl-dialanine.

TÉTRAPEPTIDES

Triglycyl-glycine.
 d.l.leucyl-diglycyl-glycine.
 Dileucyl-glycyl-glycine.
 Diglycyl-cystine.
 Dialanyl cystine.
 Dileucyl-cystine.

PENTAPEPTIDE

Tétraglycyl-glycine.

HEXAPEPTIDES

Pentaglycyl-glycine.
 Leucyl-tétraglycyl-glycine.

HEPTAPEPTIDE

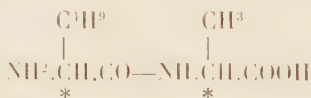
Leucyl-pentaglycyl-glycine.

Depuis 1906, un assez grand nombre de polypeptides, dérivés d'acides variés, ont encore été préparés : on en trouvera la description dans les collections de *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* et de *Annalen der Chemie und Pharmacie*.

Les propriétés des polypeptides rappellent, sous certains rapports, celles des acides aminés eux-mêmes. Ce sont des corps solides, la plupart du temps bien cristallisés, ne fondant qu'à des températures élevées (200°, 250° et plus) ou même ne montrant pas de fusion avant leur décomposition. Les polypeptides sont assez facilement solubles dans l'eau, au moins ceux qui dérivent des acides aminés supérieurs, car l'accumulation des chaînons de glycyle entrave la solubilité. Les polypeptides sont plus ou moins solubles dans l'alcool, peu dans les dissolvants neutres.

Comme les acides aminés simples, les polypeptides jouissent d'une double fonction : une fonction basique, se traduisant par la formation des chlorures, chloroplatinates et autres sels, et une fonction acide à laquelle se rapportent les éthers dont on a vu la facile préparation, ainsi que la propriété qu'ont les polypeptides de se dissoudre aisément dans les alcalis.

L'isomérisie d'ordre stéréochimique est très répandue dans la famille des polypeptides. Sauf le glycocolle, tous les acides aminés qui fournissent la décomposition des albuminoïdes et qui entrent dans l'architecture des polypeptides, renferment un atome de carbone asymétrique : les glycyles mis à part, tout polypeptide à n chaînons renferme donc n carbones asymétriques et doit pouvoir se présenter, d'après les lois générales de la stéréochimie, sous 2^n formes stéréochimiques différentes, racémisables deux à deux. Par exemple, la leucyl-alanine :



qui renferme deux carbones asymétriques, désignés ici par des astérisques, doit se présenter sous les quatre formes dd' et ll' , dl' et ld' , constituant en tout deux paires racémiques,

De fait, les produits que l'on obtient en préparant les dipeptides, à l'aide de deux corps d'origine synthétique, racémiques par conséquent, peuvent quelquefois être fractionnés en deux substances différentes A

et B, toutes deux inactives sur la lumière polarisée. Citons le cas de l'alanyl-leucine, du dipeptide α -aminobutyrique, de la leucyl-isosérine, etc., etc. Dans beaucoup de cas, on n'a obtenu qu'un seul produit : on peut alors admettre, soit que les deux racémiques isomères ne présentent pas assez de différences dans les propriétés pour permettre leur facile séparation, soit que les conditions de la synthèse ont favorisé l'un des états d'équilibre au détriment de l'autre.

Lorsqu'on effectue, au contraire, la synthèse avec des corps optiquement actifs, tels que les aminoacides d'origine biologique, on obtient des polypeptides actifs, en grande partie du moins, ce qui se conçoit sans peine.

Les molécules d'acides aminés qui forment les polypeptides sont facilement remises en liberté par l'hydrolyse, ce qui rapproche les polypeptides des *peptones* naturelles. Le poids moléculaire des polypeptides élevés est du même ordre de grandeur que celui qu'il est plausible d'admettre pour les peptones ; on a d'ailleurs maintenant réussi à isoler plusieurs polypeptides bien définis et identifiés, en fractionnant des mélanges naturels de peptonisation. Beaucoup de polypeptides précipitent, comme les peptones, par l'acide phosphotungstique.

Un autre point de ressemblance avec les peptones est l'action de divers polypeptides ou de leurs dérivés sur les sels de certains métaux lourds, le cuivre notamment (ainsi que le nickel et le cobalt). Depuis longtemps on a remarqué que plusieurs de ces dérivés, la « base biurétique » de TH. CRATON par exemple (triglycyl-glycinate d'éthyle), et l'« acide γ » du même auteur (benzoyl-pentaglycyl-glycine), confèrent aux sels cuivriques, en présence d'un excès d'alcali, la coloration rose pourprée si employée par les biologistes, sous le nom de « réaction du biuret », pour la reconnaissance des peptones. La triglycyl-glycine et la pentaglycyl-glycine, à l'état de liberté, donnent elles-mêmes une magnifique réaction du biuret. D'autres polypeptides se comportent de même : ils renferment tous au moins trois molécules d'acides aminés, c'est-à-dire au moins deux fois les chaînons de liaison ($-\text{CO}-\text{NH}-$).

Une question des plus importantes au point de vue biologique est l'action des diastases protéolytiques sur les polypeptides. Dès 1903, E. FISCHER et P. BERGELL (1) avaient constaté que les dérivés carbéthoxy- et β -naphtalènesulfo- de la glycyl-tyrosine et de la glycyl-leucine sont dédoublés par la *trypsine*. Il était même très remarquable de voir

1. E. FISCHER u. P. BERGELL. Ueber die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2592, 1903).

que les dérivés de la glycyl-leucine, préparés à l'aide de la leucine synthétique, et par suite racémiques, sont attaqués asymétriquement, c'est-à-dire que l'un des isomères est détruit par la trypsine, tandis que l'autre est respecté.

E. FISCHER (1) avec l'aide de P. BERGELL (2) et de E. ABDERHALDEN (3), a repris cette expérience sur un grand nombre de polypeptides libres, en utilisant le suc pancréatique frais obtenu du chien par le procédé de PAWLOW. Certains polypeptides sont attaqués, d'autres restent insensibles; chez les racémiques, en général l'un des isomères est détruit, laissant l'autre isomère optiquement actif; il y a là un moyen d'obtenir des corps actifs, et même d'établir des constitutions.

Les premiers essais d'attaque des dipeptides par le suc gastrique (recueilli chez le chien par le procédé PAWLOW) ont échoué: les cinq dipeptides étudiés par E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (4) ont résisté: glycyl-l.tyrosine, d.alanyl-cystine, leucyl-alanine, leucyl glycine, leucyl-leucine.

Depuis ces premiers travaux, un très grand nombre d'autres ont été accomplis par divers auteurs, notamment par E. ABDERHALDEN et ses collaborateurs, pour étudier, soit l'action des sucs digestifs sur de nombreux polypeptides, soit les destinées des polypeptides introduits dans l'organisme. Quel que soit l'intérêt biologique de ces travaux (5), nous ne pouvons les passer ici en revue, ce qui nous écarterait un peu de notre sujet, le mécanisme de la synthèse albuminoïde.

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. II (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 2486, 1904).

2. E. FISCHER u. P. BERGELL. Spaltung einiger Dipeptide durch Pankreasferment (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 3403, 1904).

3. E. FISCHER u. E. ABDERHALDEN. Ueber das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft (*Z. physiol. Chem.*, 46, 52, 1905).

4. E. FISCHER u. E. ABDERHALDEN. *Loc. cit.*

5. Le lecteur les trouvera facilement dans *Zeitschrift für physiologische Chemie*, *Biochemische Zeitschrift*, *Journal of biological Chemistry*, etc.

VI. — RECHERCHE DU MÉCANISME NATUREL DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

La synthèse des polypeptides par E. FISCHER a eu un grand et légitime retentissement : elle a donné aux chimistes la certitude définitive sur l'un des traits les plus essentiels de la structure des albuminoïdes.

Mais si les desiderata de la pure chimie constitutionnelle s'estiment ainsi comblés, en est-il de même pour les sciences biologiques, et celles-ci peuvent-elles trouver dans les remarquables travaux de E. FISCHER le secret de la formation naturelle des albuminoïdes chez les êtres vivants? Evidemment non.

La méthode de E. FISCHER a pour double caractère d'être indirecte et artificielle. Elle est *indirecte* car elle ne soude pas ensemble une série d'acides aminés préexistants ; mais, pour *construire* le $n^{\text{ème}}$ amino-acide à l'extrémité d'une chaîne de rang $(n-1)$, elle est obligée d'apporter *successivement des fragments* qui ne constitueront la molécule de l'acido-acide qu'après un ensemble de réactions. Elle est *artificielle*, car elle met en jeu l'alcool absolu, le gaz chlorhydrique, le brome, le chlorure de thionyle, l'ammoniaque concentrée, bref tout un arsenal de réactifs violents dont ne disposent pas le corps humain ni les autres organismes vivants.

La nature procède tout autrement. Notre organisme reçoit une série d'acides aminés séparés les uns des autres par le jeu de la digestion ; et ce sont ces aminoacides entiers que doit réassocier notre muqueuse intestinale pour en constituer nos propres matériaux albuminoïdes. Pour éclairer le mécanisme de ce processus direct et naturel, il est donc indispensable de trouver une nouvelle synthèse des polypeptides qui réponde aux deux conditions suivantes :

1^o Partir, non point d'un chlorure d'acide halogéné ou de quelque autre fragment non biologique, mais bien des *acides aminés eux-mêmes*.

2^o Obtenir l'enchaînement peptidique de ces acides aminés sans recourir à l'intervention d'autres substances que *celles dont dispose l'organisme*.

Tel est le problème auquel je me suis efforcé d'apporter une contribution. J'ai eu la bonne fortune de rencontrer dans une substance très répandue chez les êtres vivants, la *glycérine*, un agent de condensation qui m'a permis de réaliser déjà la synthèse d'un certain nombre de

polypeptides, par un procédé qui pour la première fois ne semble pas heurter notre conception des phénomènes biologiques.

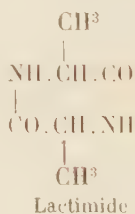
Dans l'exposé qui va suivre, on verra que le glycolle, maintenu à 170° en présence de la glycérine, fournit non seulement un dipeptide cyclique, mais encore un tétrapeptide et un hexapeptide linéaires, ainsi qu'un anhydride très condensé qui est probablement un octopeptide cyclique.

Les homologues du glycolle fournissent les cyclodipeptides correspondants, qui peuvent être homogènes quant à la nature des deux constituants, ou mixtes, suivant que l'on traite un aminoacide isolé ou un mélange de deux aminoacides.

VII. — NOMENCLATURE NOUVELLE DES DIPEPTIDES CYCLIQUES : LA SÉRIE DES CYCLO-GLYCYL-GLYCINES

Les dipeptides cycliques, que m'a fournis régulièrement la condensation des acides aminés en présence de la glycérine, ne sont pas des substances inédites, et possèdent par conséquent déjà leur dénomination.

Le plus anciennement connu, qui dérive de la leucine, après avoir été considéré à tort comme le *nitrile de l'acide leucique*, avait reçu le nom de *leucinimide* (1), et de même le dipeptide cyclique dérivé de l'alanine avait été qualifié de *lactimide* :

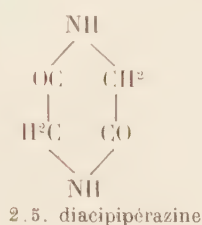
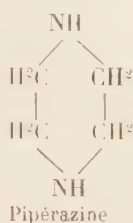


Mais on voit que la dénomination d'*imides* ne paraît pas très justifiée; aussi TH. CURTIUS abandonna-t'il très vite la désignation de *glycocolimidanhydride* à laquelle il avait d'abord songé pour l'anhydride

1. On trouvera plus loin, dans la Deuxième Partie du présent travail, à propos de l'*Action de la glycérine sur la leucine*, un paragraphe consacré tout entier à l'histoire et à la revision critique des « leucinimides ».

double de glycocolle découvert par lui, et se contenta-t'il de le nommer *glycocollanhydride* ou *glycinanhydride*.

C'est ce même glycinanhydride que E. FISCHER (1) étudia à son tour sous le nom de *2.5.diacipipérazine*, dénomination qui s'explique en considérant les relations théoriques du corps avec le cycle de la pipérazine et de la pyrazine :



Dans ses premiers mémoires, E. FISCHER désigna donc tous les dipeptides cycliques de la série sous le nom de *2.5.diacipipérazines* : la lactimide était la *3.6.diméthyl-2.5.diacipipérazine* ; la leucinimide était la *3.6.diisobutyl-2.5.diacipipérazine*, etc.

Plus tard, E. FISCHER revint au nom de *dikétopipérazines* qui avait été employé antérieurement par C.-A. BISCHOFF, par P.-W. ABENIUS et O. WIDMANN, etc., pour désigner tout un nombreux groupe de combinaisons synthétiques portant sur l'azote des radicaux aromatiques et dont il est inutile de parler ici, car elles n'ont pas de relation avec l'étude des acides α-aminés et des polypeptides. La dénomination de dikétopipérazines est employée notamment dans l'ouvrage d'ensemble réimprimé par E. FISCHER (2) en 1906. Voici textuellement ce qu'en dit l'auteur (3) :

« Ce nom *dikétopipérazines*, employé originellement par C.-A. BISCHOFF comme par ABENIUS et WIDMANN (*Ber.*, 21, 1257 et 1662, 1888), a été plus tard remplacé par *diacipipérazines*. J'ai employé ce dernier nom jusqu'à ce que A. HANTZSCH, qui veut réserver la désignation *aci* pour un autre usage, ait de nouveau proposé *dikétopipérazines* (*Ber.*, 38, 998, 1905). Bien que des objections puissent être élevées là-contre, et bien qu'il soit peut-être meilleur ici d'employer, suivant une proposition que me faisait à titre privé Herr P. JACOBSON, l'expres-

1. E. FISCHER. Ueber die Ester der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 433, 1901).

2. E. FISCHER. *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine* (1899-1906). Berlin, J. Springer, 1906.

3. E. FISCHER. *Loc. cit.*, p. 28, en note.

sion provenant de KÉKULÉ : *Dioxo* (voir ANSCHÜTZ et PARLATO, *Ber.*, 25, 1977, 1892), il me paraît encore préférable de ne plus faire provisoirement aucun changement, parce qu'on provoquerait par là quelque confusion. »

Sans vouloir prendre parti entre les préfixes *dikéto*, *diaci*, *dioxo*, et sans vouloir me permettre de contester le moins du monde la légitimité théorique de la nomenclature qui rattache à la pipérazine les substances en question, je crois pouvoir faire remarquer que cette nomenclature n'est pas pratique pour l'usage courant, parce qu'elle a le défaut de masquer les relations directes, et en fait incessantes, des corps dont il s'agit avec les acides aminés.

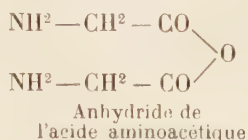
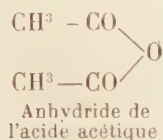
Il est certain que l'énoncé d'un nom tel que *3.paraoxyphénylméthyl-6.isobutyl-2.5.dikétopipérazine*, ou encore *3.paraoxybenzyl-6.isobutyl-2.5.dikétopipérazine*, n'éveille pas aisément dans l'esprit une idée concrète, et qu'il faut un certain effort de traduction pour y reconnaître l'union si fréquente et si simple d'une molécule de leucine avec une molécule de tyrosine. (On verra tout à l'heure qu'en exprimant cette idée par la dénomination de *cyclo-tyrosyl-leucine*, je crois la traduire d'une façon plus représentative).

Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que si E. FISCHER adopte en théorie la dénomination de dikétopipérazines, il ne l'utilise que fort peu lui même dans la pratique, et désigne couramment, dans ses mémoires, les substances en question par un nom qui rappelle précisément leur qualité d'anhydrides des aminoacides. Par exemple : *Glycin-anhydrid*, *Alanin-anhydrid*, *Leucin-anhydrid*, *Histidin-anhydrid*, *Lysin-anhydrid*, etc.; ou encore, s'il s'agit de dérivés mixtes : *Alanyl-glycin-anhydrid*, *Leucyl-glycin-anhydrid*, *Leucyl-alanin-anhydrid*, *Leucyl-tyrosin-anhydrid*, *Leucyl-prolin-anhydrid*, etc.

On reconnaît sans peine que la nomenclature des « anhydrides » est beaucoup plus significative que celle des dikétopipérazines. Pour les anhydrides mixtes, elle fait image, et l'on souhaiterait seulement que les anhydrides homogènes fussent désignés, eux aussi, de noms rappelant les *deux* molécules d'acides aminés qui les constituent, bien que ces deux molécules soient de même espèce. Pour éviter de désigner des corps de même structure par des noms de construction différente, il serait nécessaire de ne plus dire *Glycin-anhydrid*, *Leucin-anhydrid*, etc., mais bien *Glycyl-glycin-anhydride*, *Leucyl-leucin-anhydride*, etc.

Mais plutôt que de chercher à corriger la nomenclature des « anhydrides » pour pouvoir la conserver, il me semble plus opportun de ne pas souhaiter cette conservation. Elle conduirait en effet à ceci que les

« anhydrides » d'acides aminés seraient des corps tout différents des anhydrides d'acides ordinaires. Par exemple l'anhydride de l'acide acétique et l'anhydride de l'acide aminoacétique (glycocolle) ne seraient des substances comparables que si leurs noms désignaient les molécules que voici :



Mais on ne peut guère approuver un parallélisme de dénomination entre des corps aussi différents que l'anhydride acétique et la 2.5.dikétopipérazine.

Même si l'on sous-entend que dans les anhydrides d'acides *aminés* il s'agit d'anhydrisation peptidique entre carboxyle et aminogène de molécules voisines, l'expression « glycinanhydride » peut encore désigner, non seulement la 2.5.dikétopipérazine, mais aussi la cyclo-polyglycyl-glycine dont il sera question plus loin, mais aussi la glycyl-glycine, la diglycyl-glycine, la triglycyl-glycine, etc., bref toute une série de substances qui toutes, à des titres divers, sont des anhydrides de la glycine.

En présence de toutes ces confusions et complications, j'ai donc proposé (1) d'abandonner en bloc tous les noms anciens, pour adopter une nomenclature nouvelle, qui a le *triple avantage* de traduire d'une façon *simple, précise, et complète*, la constitution du corps. Elle indique, sans la moindre ambiguïté possible, la structure cyclique de la molécule, la nature des deux aminoacides qui la composent, et jusqu'à la variété stéréochimique de chacun de ceux-ci. Voici des exemples :

Cyclo-glycyl-glycine.

Cyclo-d.alanyl-glycine.

Cyclo-d.alanyl-d.alanine.

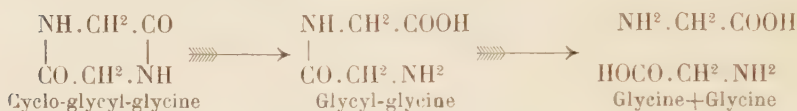
Cyclo-l.alanyl-d.alanine.

Cyclo-l.tyrosyl-l.leucine, etc.

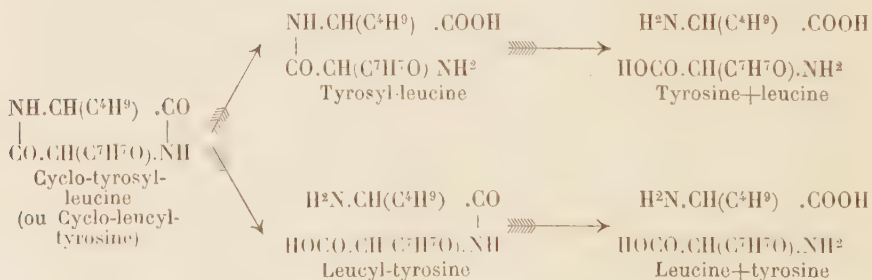
1. L. C. MAILLARD. Condensation des acides aminés en présence de la glycérine : cycloglycylglycines et polypeptides (*C. R. Ac. Sc.*, 153, 1078, 1911). — Synthèse des peptides inférieurs par une méthode nouvelle et directe, voisine des réactions biologiques (*C. R. Soc. Biolog.*, 71, 546, 1911). — Recherche du mécanisme naturel de formation des albuminoïdes (*Presse médicale*, 1912, 441).

La série des 2.5.dikétopipérazines devient la *série des cyclo-glycyl-glycines*.

Ce nouveau mode de désignation rappelle aussitôt les relations directes qui unissent les dipeptides cycliques avec les dipeptides linéaires et les acides aminés eux-mêmes. Par exemple, on voit immédiatement que la *cyclo-glycyl-glycine* (glycinanhydride de TH. CURTIUS, 2.5.diacipipérazine de E. FISCHER) doit donner, par son hydrolyse ménagée (rupture d'une seule des deux liaisons), la *glycyl-glycine* de E. FISCHER et E. FOURNEAU, puis, par son hydrolyse complète (rupture des deux liaisons), deux molécules de *glycine* :



Lorsqu'il s'agit de cyclodipeptides mixtes, l'hydrolyse ménagée pouvant débiter par l'une ou l'autre des deux liaisons, on conçoit qu'un même cyclodipeptide puisse donner naissance à deux dipeptides linéaires différents, lesquels se résoudront tous deux, par hydrolyse plus avancée, en le même mélange équimoléculaire de deux aminoacides. Par exemple une même *cyclo-tyrosyl-leucine* pourra donner, à un premier stade d'hydrolyse, soit une *tyrosyl-leucine*, soit une *leucyl-tyrosine*, qui toutes deux fourniront, par deuxième hydrolyse subséquente, un mélange équimoléculaire de *tyrosine* et *leucine*.



Une même molécule de cyclodipeptide mixte peut donc être représentée par les deux noms de *cyclo-tyrosyl-leucine* et de *cyclo-leucyl-tyrosine*. Pour la régularité du langage, il est utile d'en choisir un qui sera seul usité : par convention nous énoncerons en dernier lieu l'homologue inférieur ou l'acide aminé le moins complexe. Ainsi on dira *cyclo-leu-*

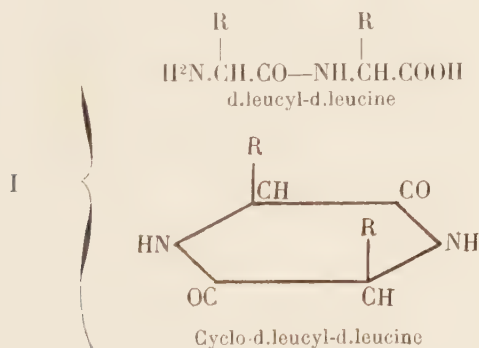
cyl-valine (et non *cyclo-valyl-leucine*), *cyclo-tyrosyl-leucine* (et non *cyclo-leucyl-tyrosine*), etc.

Enfin ma nomenclature se prête très bien à la distinction des isomères optiques qui entrent dans la constitution des *cyclo-glycyl-glycines* : elle a même l'avantage de faire saisir instantanément le mode d'isomérisie de ces dipeptides cycliques, et le nombre des isomères possibles, ainsi qu'on en trouvera un exemple frappant dans la revision critique des « leucinimides » que j'ai faites à propos de l'*Action de la glycérine sur la leucine*.

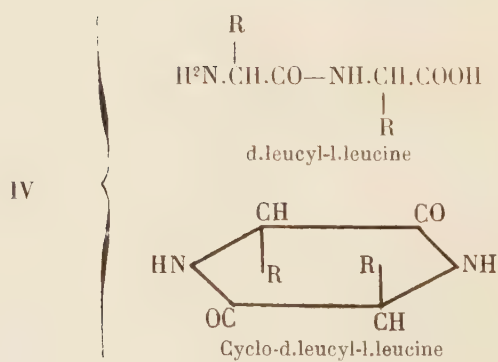
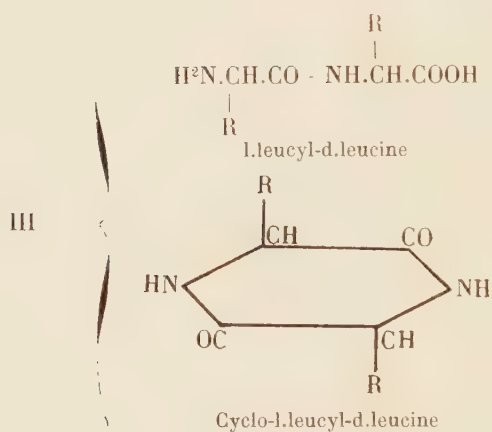
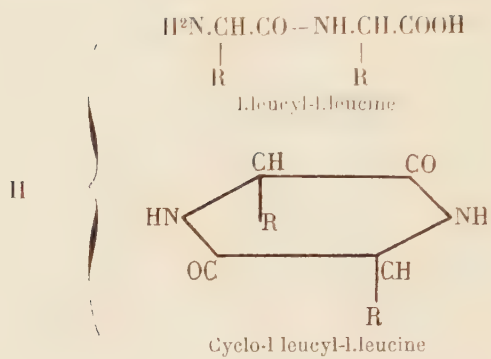
L'existence des deux formes antipodes de chaque aminoacide, la *d*.leucine et la *l*.leucine par exemple, permet de prévoir quatre dipeptides linéaires, quatre leucyl-leucines, qui seront :

- 1) *d*.leucyl-*d*.leucine.
- 2) *l*.leucyl-*l*.leucine.
- 3) *l*.leucyl-*d*.leucine.
- 4) *d*.leucyl-*l*.leucine.

Si l'on considère les cyclisations qui se produiront par la fermeture respective des quatres chaînes dipeptidiques, on aura le tableau suivant de la structure stérique des quatre dipeptides linéaires et des dipeptides cycliques qui en dérivent :



INTRODUCTION



Il est aisé de voir qu'ici les cyclodipeptides 3 et 4 possèdent en réalité la même structure, et que si l'on doit s'attendre à rencontrer deux dérivés *cis* antipodes et racémisables, la cyclo-d.leucyl-d.leucine et la cyclo-l.leucyl-l.leucine, on ne doit en revanche trouver qu'un seul dérivé *trans*, inactif sur la lumière polarisée.

Cet unique dérivé *trans* pourrait porter les deux noms de cyclo-l.leucyl-d.leucine et de cyclo-d.leucyl-l.leucine. Ici encore, pour éviter toute confusion, nous choisirons par convention une seule dénomination, celle qui énonce en dernier lieu l'isomère d. Le dérivé *trans* sera appelé *cyclo-l.leucyl-d.leucine* (et non cyclo-d.leucyl-l.leucine).

Il me semble donc assez plausible de penser que ma nomenclature des cyclo-glycyl-glycines pourra, tout en écartant toute confusion, s'adapter aux diverses exigences de la pratique.

VIII. — DIVISIONS DU TRAVAIL

Le présent travail est divisé en quatre parties.

Dans la Première Partie est étudiée l'action de la *glycérine* sur le *glycocolle* lui-même : elle donne naissance, non seulement à la *cyclo-glycyl-glycine*, mais aussi à une série de *chaînes polyglycylques supérieures*, d'un intérêt tout particulier.

La Deuxième Partie comprend l'action de la *glycérine* sur les *homologues* du glycocolle, tout au moins sur un certain nombre d'acides α -aminés pris pour types, soit que la substitution porte sur l'azote (sarcosine), soit qu'elle se rattache au carbone (alanine, leucine). Chacun de ces aminoacides est traité isolément et à l'état pur : le produit fondamental de la réaction consiste en *cyclo-glycyl-glycines* (2.5.dikétopipérazines) homologues, et *homogènes*, c'est à-dire que les deux restes d'acides aminés dont l'enchaînement constitue leur molécule sont identiques.

La Troisième Partie donne quelques exemples des condensations qui se produisent lorsqu'on traite par la *glycérine* des *mélanges d'acides aminés* : on obtient des *cyclo-glycyl-glycines mixtes*, c'est à dire où les deux parties du cycle moléculaire proviennent de deux aminoacides d'espèces différentes.

La Quatrième Partie étudie l'action des *sucres* sur les *acides α aminés* : on y constate la formation de substances très curieuses, identiques aux

mélanoïdines ou aux *matières humiques azotées* des auteurs, réaction générale dont la découverte est de nature à éclairer la structure de ces substances jusqu'alors mystérieuses dans leur origine comme dans leur constitution.

PREMIÈRE PARTIE

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LE GLYCOCOLLE

(Synthèse de la cyclo-glycyl-glycine et des chaînes polyglycyliques paires)

CHAPITRE PREMIER

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LE GLYCOCOLLE

Expériences de Balbiano et Trasciatti. — L'action de la glycérine sur le glyocolle a été étudiée déjà par L. BALBIANO et D. TRASCIATTI (1), qui cherchaient à obtenir des glycérides de l'acide amino-acétique, comparables à ceux qui résultent de la réaction directe de l'acide acétique sur la glycérine.

Ces auteurs plaçaient dans un tube scellé 20 gr. de glyocolle finement pulvérisé et 10 gr. de bonne glycérine commerciale, rendaient le mélange homogène par chauffage au bain-marie, puis chauffaient à 150°-170° pendant 24-30 heures. A l'ouverture du tube on notait une légère pression interne et une odeur ammoniacale nette, ainsi que la coloration de la masse en brun par une matière soluble dans l'alcool et dans l'eau avec dichroïsme rouge-vert assez intense. Mais la glycérine semblait n'avoir pas pris part à la réaction : on la retrouvait à peu près intégralement.

Le produit fondamental obtenu par L. BALBIANO et D. TRASCIATTI est une poudre amorphe, légèrement colorée en jaune, rappelant les substances cornées, sans saveur, insoluble dans l'eau, même bouillante, et dans tous les dissolvants neutres. Les analyses concordent avec la composition d'un *anhydride de glyocolle* (C^2H^3NO)ⁿ, dont les auteurs n'ont pu déterminer la grandeur moléculaire, à cause de son insolubilité dans la naphthaline fondue, dans le phénol, et dans le bromure d'éthylène. Chauffée dans un tube de verre à paroi mince, cette substance se carbonise à 250° sans fondre, et calcinée sur une lame de platine elle

1. L. BALBIANO et D. TRASCIATTI, Ueber ein neues Derivat des Glykokolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 33, 2323, 1900). — L. BALBIANO, Ueber ein neues Glykokollanhydrid (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 1501, 1901). — L. BALBIANO, Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, I, 440, 1902).

dégage l'odeur caractéristique de la corne brûlée, laissant une trace de cendres.

Cet anhydride, insoluble dans l'eau, est attaqué par HCl fumant, qui le dissout en 40 heures à froid, en une demi-heure à chaud, le transformant en glyocolle. Il n'est pas sensiblement hydrolysé à froid par H^2SO^4 à 38 0/0, même après 15 jours; mais on obtient la dissolution complète en chauffant en tube scellé à 110° pendant 2 heures: le glyocolle est ainsi régénéré. Chauffé avec de l'eau en tube scellé pendant 8 heures à 110°-115°, l'anhydride n'est pas attaqué le moins du monde; si l'on chauffe pendant 8 nouvelles heures à 160°-170°, on obtient la dissolution, avec régénération du glyocolle.

Cet anhydride corné est le produit principal de la réaction, d'après L. BALBIANO et D. TRASCIATTI, qui en ont toujours obtenu 8 gr. en partant de 20 gr. de glyocolle. Or on calcule que 1 gr. de glyocolle doit fournir $1 \times \frac{(C^2H^3NO)^n}{n(C^2H^3NO)^2} = 1 \times \frac{57}{75} = 0$ gr. 7600 d'anhydride.

20 gr. de glyocolle correspondant par suite à $0,76 \times 20 = 15,2$ gr. d'anhydride, on voit que le rendement pratique en anhydride corné est un peu supérieur à 50 0/0 (52,6 0/0). Il est donc vrai que la réaction prépondérante, dans les expériences de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI, est celle qui aboutit à l'anhydride corné: ceci est important à retenir.

Dans les eaux de lavage de l'anhydride corné, L. BALBIANO (1) a ultérieurement découvert une petite quantité de l'anhydride bi-moléculaire $C^4H^6N^2O^2$ de TH. CURTIUS (2) (2.5.diacipipérazine de E. FISCHER (3), substance cristallisée que l'auteur a identifiée par des caractères suffisamment nets, sur lesquels nous n'avons pas à insister pour l'instant. 20 gr. de glyocolle ont fourni à L. BALBIANO environ 1 gr. de 2.5.diacipipérazine, soit environ 6,6 0/0 seulement du total possible. La formation de la 2.5.diacipipérazine est donc, d'après L. BALBIANO, tout à fait accessoire par rapport à celle de l'anhydride corné.

1. L. BALBIANO. Ueber ein neues Glykokollanhydrid (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 1501, 1901). — L. BALBIANO. Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, I, 440, 1902).

2. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol. Vorläufige Mittheilung (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883). — TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F. 37, 150, 1888). — TH. CURTIUS u. H. SCHULZ. Moleculargrösse des Glycins und des Glycinanhydrids (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 23, 3041, 1890).

3. E. FISCHER. Ueber die Ester der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 433, 1901).

Enfin il faut noter la production d'une petite quantité de matières résineuses brunes solubles avec fluorescence vert-rouge, et un léger dégagement d'ammoniaque.

On peut caractériser ces résultats en disant qu'ils dénotent, non pas une réaction de glyocolle sur glycérine, mais bien une réaction de glyocolle sur glyocolle, où la glycérine n'intervient qu'à titre de milieu déshydratant, pour former comme produit fondamental l'anhydride corné, et à titre tout à fait accessoire un peu d'anhydride bimoléculaire.

Expériences personnelles. — Avant même de connaître les expériences de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI, j'avais tenté, il y a plusieurs années déjà, de faire réagir le glyocolle sur la glycérine, et cela dans des conditions qui m'avaient semblé les plus favorables. Le glyocolle en solution aqueuse concentrée était incorporé à un fort excès de glycérine, puis chauffé progressivement jusqu'à 170° pour chasser l'eau, température qui était ensuite maintenue pendant un certain temps. Lorsque j'ai eu connaissance des résultats des auteurs précédents, j'ai persisté dans ma manière de faire, qui me semblait présenter des avantages sur celle de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI :

1° La dissolution du glyocolle solide, même finement pulvérisé, dans la glycérine à 30° B., même chauffée au bain-marie, est moins commode que la simple addition de la solution aqueuse ;

2° Plus la teneur en glyocolle est forte par rapport à la glycérine, plus on court le risque d'avoir une réaction mutuelle des molécules de glyocolle, plutôt qu'une réaction de glyocolle sur glycérine. Pour rechercher l'éthérification éventuelle de la glycérine par le glyocolle, il y a donc avantage à prendre un excès de glycérine, quitte à n'obtenir d'abord qu'un monoglycéride, et à étudier ensuite les moyens de parfaire, s'il y a lieu, l'éthérification triple :

3° L'usage du tube scellé (ou d'un vase clos quelconque) me paraît plus désavantageux qu'utile, parce qu'il s'opposerait au départ de l'eau d'éthérification ou d'anhydrisation, limitant ainsi la réaction. Je préfère exécuter la réaction en vase ouvert : lors de la chauffe progressive jusqu'à 170°, toute l'eau préexistante s'élimine (en même temps que quelques vapeurs de glycérine, ce qui est sans importance), puis l'eau produite dans la réaction peut s'échapper intégralement à mesure de sa formation.

La réaction ainsi conduite m'a donné des résultats qui concordent, par leur caractère général, avec ceux de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI (c'est-à-dire qu'il ne s'agit pas d'une éthérification de la glycérine,

mais bien d'une anhydrisation du glyocolle), mais qui en diffèrent notablement par certains points importants.

Origine et contrôle du glyocolle. — Comme dans tous les travaux sur les acides aminés, il me semble utile d'indiquer l'origine des matériaux employés, ainsi que les contrôles d'identité et de pureté auxquels ils ont été soumis.

La glycérine était simplement le produit fourni par le commerce sous le nom de glycérine pure à 30° B., parfaitement incolore, exempte de cendres.

Pour mes premiers essais, j'avais préparé le glyocolle par hydrolyse chlorhydrique de la gélatine, et triple éthérisation des acides aminés dans l'alcool absolu par saturation de HCl gazeux, suivant la technique de E. FISCHER, P.-A. LEVENE et R.-H. ADERS (1). Le chlorhydrate de glycinate d'éthyle $\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COO} \cdot \text{C}^2\text{H}^5$ cristallise abondamment dans le liquide refroidi, à la condition que la teneur en HCl de ce liquide soit notablement inférieure à la saturation (2); essoré et recristallisé deux fois dans le minimum d'alcool absolu bouillant, le chlorhydrate était parfaitement blanc (3).

Remis en solution aqueuse assez concentrée et refroidie dans un mélange de glace et de sel, le chlorhydrate est additionné, suivant la technique de E. FISCHER (4), d'une grande quantité de carbonate de potassium en poudre, puis de lessive de soude réfrigérée par portions successives, en même temps qu'on épuise le magma par agitation avec de l'éther plusieurs fois renouvelé. La solution éthérée du glycinate d'éthyle $\text{H}^2\text{N} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COO} \cdot \text{C}^2\text{H}^5$ est bien desséchée sur le sulfate de sodium anhydre, puis distillée dans le vide à température inférieure à 30°. Dès que tout l'éther a distillé, on installe sur le ballon un réfrigérant ascendant, par lequel on verse une grande quantité d'eau bouillante puis un peu de H^2SO^4 , et on maintient en ébullition pendant

1. E. FISCHER, P. A. LEVENE, u. R. H. ADERS. Ueber die Hydrolyse des Leims (*Z. physiol. Chem.*, 35, 70, 1902).

2. Cette condition, que mes constatations personnelles répétées m'ont obligé à reconnaître, ne concorde pas avec les données de E. FISCHER, P. A. LEVENE et R. H. ADERS.

3. C'est au cours de cette purification du chlorhydrate de glycinate d'éthyle, que j'ai eu l'occasion d'observer le curieux phénomène de *Cristallisation périodique dans l'espace, reproduisant certaines structures cytologiques*, que j'ai décrit et photographié à cette époque (*C. R. Soc. Biolog.*, 58, 1, 855, 1906).

4. E. FISCHER Ueber die Ester der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 433, 1901).

1 heure pour saponifier le glycinate d'éthyle et hydrater la 2.5.diacipipérazine qui aurait pu se former. On ajoute enfin du carbonate de baryum pulvérulent, en excès par rapport à H^2SO^4 introduit, on maintient l'ébullition pendant encore 20 minutes, et on filtre.

Le glyocolle, recueilli par concentration de la solution au bain-marie jusqu'à pellicule et essorage des petits cristaux, a été soumis à une deuxième cristallisation dans les mêmes conditions. Parfaitement blanc, exempt de cendres, il n'a pas été analysé.

Dans la suite un grand nombre d'expériences ont été faites avec du glyocolle synthétique, que j'ai préparé d'après le procédé de K. KRAUT (1), avec la technique suivante. Dans un ballon de 5 litres on place 3 litres d'ammoniaque pure à 26°B. ; on dissout 250 grammes d'acide monochloracétique dans le minimum d'eau (son volume environ), et on verse goutte à goutte cette solution dans l'ammoniaque, en agitant bien. Après 48 heures de repos on distille la majeure partie de NH^3 au bain-marie, on verse le liquide du ballon dans une capsule de 8-10 litres, et on chauffe doucement à feu nu pour chasser les dernières traces de NH^3 , jusqu'à réaction *légèrement acide*.

On verse dans la capsule une bouillie d'oxyde cuivrique précipité (2), qui se dissout en un liquide bleu foncé, et qu'on ajoute en excès tant qu'il s'en dissout, en maintenant la température voisine de l'ébullition. On filtre alors le petit excès d'oxyde cuivrique, et on concentre doucement, à feu nu, jusqu'à ce que le glycollate de cuivre commence à cristalliser à *chaud*. On transporte rapidement dans un vase cylindrique de 5 litres, et on verse aussitôt $\frac{5}{4}$ de volume d'alcool à 95^0 - 96^0 , en agitant parfaitement.

Le lendemain on essore les cristaux bleus de glycollate cuivrique, on les redissout dans le minimum d'eau chaude, et on ajoute $\frac{5}{4}$ de volume d'alcool. On refait de même une troisième, puis une quatrième précipitation (3). Le glycinate cuivrique est alors parfaitement débarrassé de chlorure, et pur. On l'introduit dans un ballon de 5 litres, qu'on remplit d'eau à moitié et qu'on installe dans un bain-marie; quand le liquide est chaud on fait passer H^2S qui précipite CuS à me-

1. K. KRAUT, Glycocol und Derivate *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 266, 292, 1891).

2. On recommande quelquefois, en vue de cette opération, de glacer les solutions de cuivre et d'alcali qui servent à la précipitation de l'oxyde, ainsi que les lavages, afin d'éviter l'altération de l'hydrate cuivrique bleu gélatineux $\text{Cu}(\text{OH})^2$ d'abord précipité. J'ai constaté maintes fois que cette précaution est inutile.

3. A mesure qu'ils se purifient, les cristaux de glycinate de Cu, d'abord

sure que le glycinate de cuivre se dissout. Quand le liquide est décoloré et sent fortement H^2S , on filtre et lave le résidu de CuS . Le liquide refroidi est débarrassé de H^2S par barbotage au moyen du courant d'air d'une trompe, puis concentré à cristallisation.

Par refroidissement le glycolle cristallise en fins cristaux, et la reconcentration des eaux-mères fournit en tout trois fractions très blanches, exemptes de cendres. Les dernières eaux-mères, un peu jaunes, sont écartées.

L'analyse centésimale a été faite sur échantillon moyen de plus de 1 kilogramme de glycolle synthétique accumulé. Elle a donné les chiffres suivants :

I. — Substance : 0 gr. 3615. — CO^2 : 0 gr. 4246 — H^2O : 0 gr. 2329 — $\text{C} = 32,03\ 0/0$ — $\text{H} = 7,16\ 0/0$.

II. — Substance : 0 gr. 4486. — Méthode DUMAS. N^2 dégagé : 24 cc. 6 à $17^{\circ}5$ et 735 mm. = 27 mgr. 3257 -- $\text{N} = 18,39\ 0/0$.

III. — Substance : 0 gr. 4240. — Méthode DUMAS. N^2 dégagé : 49 cc. 9 à $17^{\circ}5$ et 740,3 mm. = 22 mgr. 2658 — $\text{N} = 18,40\ 0/0$.

THÉORIE pour $\text{C}^2\text{H}^5\text{NO}^2$		ANALYSE		
		I	II	III
$\text{C}^2 = 24$	32,00	32,03	—	—
$\text{H}^5 = 5$	6,67	7,16	—	—
$\text{N} = 14$	18,67	—	18,39	18,40
$\text{O}^2 = 32$	—	—	—	—
$\text{C}^2\text{H}^5\text{NO}^2 = 75$	100,00			

Action de la glycérine sur le glycolle à 170° . — Les expériences ont été faites sur des quantités de glycolle pur variant de 5 gr. à 100 gr., en présence de 4-6 fois leur poids de glycérine. Voici par exemple le premier essai.

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 125 cc., on introduit 5 gr. de glycolle avec 15-20 cc. d'eau chaude, et on maintient au bain-marie quelques instants pour la dissolution. On verse alors 30 gr. de glycérine

très solubles, exigent de plus en plus d'eau pour leur redissolution. Ce phénomène, joint à d'autres particularités dans l'allure des composés cuivriques des aminoacides, permet de se demander s'il n'existerait pas deux ou plusieurs dérivés de constitution isomérique ou voisine. On conçoit par exemple que le glycolle pourrait fixer Cu de deux manières au moins, soit par le carboxyle, soit par l'azote.

pure à 30° B. du commerce, et on mélange bien. La fiole est placée sur la tablette d'une étuve à air, qu'on chauffe aussitôt et qui atteint 140° au bout de 1/2 heure. Après 50 minutes le thermomètre est à 160° et l'on voit alors seulement des bulles de vapeur monter à la surface du liquide. Au bout de 1 heure la température 170° est atteinte, et on règle le gaz de manière à la maintenir constante (à 1°-2° près) pendant 6 nouvelles heures.

Après 3 heures environ à 170°, le mélange commence à blondir, puis prend une teinte d'abord rouge acajou, puis marron. En même temps il se dégage, en outre de quelques vapeurs de glycérine, une légère odeur évoquant les odeurs pyridiques, mais spéciale (1).

Le lendemain, la masse refroidie, assez épaisse, de couleur brun noirâtre, montre sur les parois de petits cristaux qui augmentent de quantité pendant 2 jours. Le 3^{ième} jour la masse est délayée dans l'alcool absolu, et finalement transportée dans un matras de 625 cc. qu'on remplit d'alcool absolu. Après repos on filtre : il passe un liquide alcoolique brun-rouge, à fluorescence jaune-vert très intense, et il reste sur filtre un dépôt pulvérulent brun-noir, non adhérent.

Le dépôt insoluble dans l'alcool absolu renferme au moins deux substances, sans parler de plusieurs autres qui peuvent s'y trouver en faible quantité, et dont il sera question plus loin. L'une de ces deux substances est brun-noir, amorphe, instantanément soluble dans l'eau. L'autre est formée de petits cristaux peu colorés, solubles eux aussi dans l'eau, mais bien moins vite que la matière brune.

Le dépôt noirâtre est redissous dans l'eau chaude ; la solution, additionnée de noir animal, lui cède immédiatement sa matière brune, et le liquide filtré n'a plus qu'une teinte madère. Par évaporation il laisse un résidu de cristaux blancs souillés de matière jaune, qu'on purifie deux fois en agitant pendant le refroidissement de la solution aqueuse saturée à chaud : les derniers cristaux sont presque blancs, d'une teinte très légèrement écru qu'il est difficile de leur enlever par simple cristallisation dans l'eau. On peut obtenir le corps en aiguilles blanches, si on additionne de 3-4 volumes d'alcool absolu la solution dans le minimum d'eau bouillante.

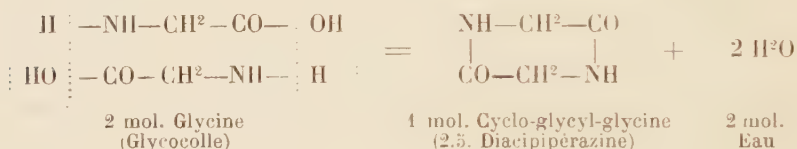
La substance cristallisée, mise en solution aqueuse, ne dissout pas trace d'oxyde cuivrique : elle diffère donc du glyocolle. Il m'a été facile de l'identifier à la *cyclo-glycyl-glycine* (2.5.diacipipérazine), par les caractères que je décrirai plus loin. C'est elle qui constitue la très

1. C'est l'odeur spéciale de la cyclo-glycyl-glycine chauffée, dont il sera question plus loin.

majeure partie des produits de transformation du glyocolle : j'ai pu en isoler jusqu'à 86 0/0 du maximum théorique, et cela par des procédés qui ne permettent pas d'en recueillir intégralement la totalité.

Cette prépondérance de la *cyclo-glycyl-glycine* (2.5. diacipipérazine), qui constitue, dans les conditions où je me suis placé, la presque totalité des produits de la réaction, est déjà un résultat nouveau, que ne permettaient pas de prévoir les expériences de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI.

La réaction fondamentale qui traduit l'action de la glycérine sur le glyocolle lorsqu'on a réalisé la dissolution complète de celui-ci et qu'on permet à l'eau formée de s'échapper librement au cours du chauffage, s'exprime donc, en apparence du moins, par l'équation :



Nous verrons plus loin que cette réaction fondamentale, si prépondérante qu'elle soit, n'est pas la seule.

Prépondérance de la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine). — Dans le but de préciser par des chiffres la prépondérance de la réaction qui aboutit à la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine), et pour étudier en outre divers autres points, tels que l'origine des matières brunes, j'ai institué l'essai suivant.

Quatre petites fioles coniques d'Erlenmeyer, jaugées au mercure, présentaient les capacités totales suivantes :

N° 1 = 146 cc. N° 2 = 123 cc. N° 3 = 120 cc. N° 4 = 100 cc.

Chacune a reçu 30 grammes de glycérine à 30°B. et 5 grammes de glyocolle pur dissous dans 15 cc. d'eau. Les quatre fioles étant placées côte à côte sur la tablette de l'étuve à air, on élève progressivement la température, qui atteint 170° au bout de 1 heure presque exactement. On maintient alors la température 170° pendant 6 nouvelles heures.

En vertu de la forme conique des fioles et de leurs différences de capacité, des volumes égaux de liquide s'élèvent d'autant plus haut dans la fiole et présentent par suite une surface libre d'autant plus restreinte que la fiole est plus petite. Les 4 échantillons offrent donc une facilité inégale au départ de la vapeur d'eau en même temps qu'à

l'action éventuelle de l'air, ces facilités décroissant de la fiole n° 1 à la fiole n° 4.

Au bout de 2 heures environ à 170°, le n° 1 commence à blondir, puis prend une teinte rouge-acajou, enfin marron. Le n° 2, puis peu après le n° 3, ne commencent à blondir qu'au bout de 3 heures environ; le n° 4 au bout de 5 heures seulement. Après 6 heures on éteint l'étuve.

Le lendemain, le n° 1 est marron-noir, de consistance assez liquide, avec des cristaux. Le n° 2 et le n° 3 sont acajou foncé, plus consistants, remplis d'une bouillie de cristaux. Le n° 4 est seulement de teinte saumonée, presque pris en masse de cristaux. Chaque échantillon est transporté, par délayage au moyen de l'alcool absolu, dans un matras de 1200 cc., qu'on remplit d'alcool absolu. Après repos, l'alcool n° 1 est orangé, avec forte fluorescence verdâtre; les alcools n° 2 et n° 3 offrent la couleur habituelle de l'urine humaine, avec un peu de fluorescence; l'alcool n° 4 est incolore. La masse cristalline déposée dans le matras 1 est noire, dans les matras 2 et 3 elle est brune, dans le matras 4 elle a une légère teinte saumonée.

Pour chacun des 4 échantillons, les cristaux sont recueillis sur filtre à plis dans un entonnoir fermé par un caoutchouc avec pince; on lave 3 fois par séjour de 2 heures dans l'alcool absolu. On épuise alors par l'eau bouillante renouvelée, et tout se dissout sauf quelques légers grains gris jaunâtre, insignifiants de quantité, dont il sera question plus tard. Chaque solution est bouillie pendant une demi-heure avec deux pincées de noir animal, et filtrée; elles ont gardé des teintes échelonnées dans l'ordre suivant:

N° 1, rougeâtre. N° 2 et N° 3, jaune rougeâtre. N° 4, jaunâtre.

Chaque solution est évaporée à sec au bain-marie dans un petit cristalliseur, le résidu est séché 2 heures à 110°, refroidi sur H^2SO^4 et pesé. Le résidu est ensuite éliminé par l'eau chaude, le cristalliseur séché à 110°, et repesé.

Poids des résidus cristallins :

N° 1 = 2 gr. 1902. N° 2 = 2 gr. 5748. N° 3 = 2 gr. 5873.

N° 4 = 3 gr. 2895.

De chacun des résidus cristallins a été prélevée, avant redissolution, une parcelle qui, calcinée sur lame de platine, s'est comportée, pour

les 3 premiers échantillons, comme la 2.5. diacipipérazine pure (allure du charbon, dégagement des vapeurs blanches et de l'odeur spécifique). Pour le n° 4, le charbon se boursoufle un peu plus, donne moins de vapeurs blanches et une odeur moins pure. D'autre part, on a prélevé sur chaque échantillon une autre parcelle, qui est bouillie avec un peu d'eau et d'oxyde cuivrique ; les n°s 1, 2, 3 restent incolores, le n° 4 prend une teinte bleue légère, mais nette. Le n° 4 renferme donc encore des traces d'acide aminé, mais qui ne doivent guère excéder l'ordre des milligrammes.

Comme les traces de matière orangée sont insignifiantes, pondéralement parlant, nous avons le droit de considérer nos échantillons cristallins comme de la cyglo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) quasi pure. Etant donné que 5 grammes de glycocolle peuvent fournir au total $0,7600 \times 5 = 3$ gr. 80 de diacipipérazine, les rendements extraits sont donc les suivants, par rapport à la théorie :

$$\begin{aligned} \text{N}^{\circ} 1 &= 57,6 \text{ 0/0.} & \text{N}^{\circ} 2 &= 67,8 \text{ 0/0.} & \text{N}^{\circ} 3 &= 68,1 \text{ 0/0.} \\ & & \text{N}^{\circ} 4 &= 86,6 \text{ 0 0.} \end{aligned}$$

Si l'on ajoute que la diacipipérazine n'est pas insoluble dans l'alcool, et que le liquide alcoolo-glycérique en contient encore une quantité notable (ce dont il est facile de s'assurer par évaporation et calcination), on voit que *la transformation du glycocolle en cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) est presque intégrale*, tout au moins si on arrête la réaction quand les matières brunes commencent à se former abondamment.

Origine de la matière brune. — L'expérience qui vient d'être décrite, et qui étudie simultanément la marche de la réaction dans les 4 essais ne différant entre eux que par l'épaisseur de la masse réagissante, est en outre très intéressante au point de vue de l'origine de la *matière brune*, que cette matière soit d'ailleurs constituée par une ou plusieurs substances, solubles ou non dans l'alcool.

Cette expérience prouve en effet que : 1° la matière brune ne dérive pas directement du glycocolle, puisqu'elle ne prend naissance qu'après la disparition de celui-ci ; 2° la matière brune se forme vraisemblablement aux dépens de la cyglo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine), puisque celle-ci diminue à mesure que la matière brune augmente. Nous retrouverons plus loin la preuve quantitative et définitive de ces opinions.

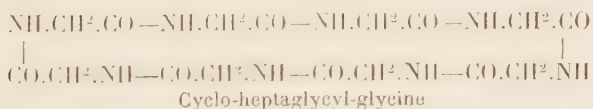
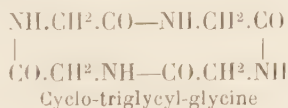
Les conditions de l'expérience conduisent à se demander si la matière brune serait un produit d'oxydation de la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine). Nous étudierons plus loin cette question.

Présence de l'anhydride « corné » polyglycylique : cyclo-polyglycyl-glycine. — Il a été dit plus haut que le produit de la réaction est tout entier soluble dans l'eau chaude, à l'exception de quelques grains assez ténus, d'un gris jaunâtre, dont la quantité est d'ailleurs pondéralement insignifiante. On peut les recueillir sur un filtre, à la condition de ne pas leur laisser subir un commencement de dessiccation, car ils adhèrent fortement au papier. On peut aussi, par la centrifugation, recueillir et laver un échantillon suffisant pour en reconnaître les caractères typiques.

Brûlant sans fondre avec une odeur qui témoigne de leur richesse en azote, insolubles dans l'eau bouillante et dans l'ammoniaque étendue bouillante, ces grains se dissolvent par une ébullition prolongée avec H^2SO^4 étendu. Bouillie avec un petit excès de carbonate de baryum, et filtrée, cette solution dissout alors l'oxyde cuivrique précipité, formant un liquide bleu foncé d'où cristallisent les fines aiguilles caractéristiques du glycocollate de cuivre.

Il est aisé de reconnaître, en cette substance remarquablement insoluble, l'anhydride « corné » de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI; mais elle ne constitue ici qu'une fraction tout à fait minime du produit de réaction.

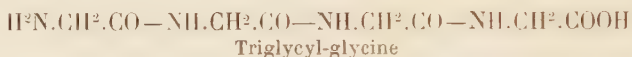
On verra plus loin les raisons qui m'ont amené à reconnaître que cet anhydride polyglycylique, cette *cyclo-polyglycyl-glycine*, doit être formée de n fois quatre, c'est-à-dire de 4 ou de 8 groupements glycyliques enchaînés en cycle fermé. Ce serait une cyclo-triglycyl-glycine, ou une cyclo-heptaglycyl-glycine :



Formation transitoire d'une substance biurétique soluble : triglycyl-glycine. — Lorsque le glycocolle a été chauffé au sein de la glycérine pendant un nombre d'heures suffisant pour que le départ de l'eau soit total et que la masse ait pris une coloration d'un brun-noir si intense que l'œil ne peut plus y reconnaître de changements, cette masse ne contient, en fait de produits de transformation du glycocolle, pas autre chose que la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipérazine), la matière brune, et l'anhydride « corné ».

Mais, en examinant la masse avant que la réaction soit complète, vers les heures où elle commence à brunir fortement, j'ai constaté que cette masse est intégralement soluble dans l'eau, sans le moindre résidu d'anhydride « corné », et j'ai découvert que la solution donne avec une intensité tout à fait remarquable la *réaction du biuret*, d'une magnifique teinte rose-carmin.

Après une série de tentatives, se heurtant à des difficultés dont on verra tout à l'heure les causes, j'ai réussi à isoler à l'état de pureté parfaite la substance biurétique soluble dans l'eau, et à lui reconnaître, en toute certitude, la constitution d'un tétrapeptide, la *triglycyl-glycine*.



Le mode d'isolement et les caractères de ce corps seront décrits en détail dans la suite du présent travail.

Lorsque le processus d'anhydrisation se poursuit, la triglycyl-glycine disparaît peu à peu, et la solution du produit perd la propriété de fournir la réaction du biuret. C'est précisément à l'époque de cette disparition de la triglycyl-glycine qu'apparaissent les granulations insolubles d'anhydride « corné », et l'on verra plus loin les renseignements qu'apporte ce phénomène sur la structure de l'anhydride « corné ». Dérivant de la triglycyl-glycine, c'est-à-dire d'un tétrapeptide, sa molécule ne peut être formée que de 4 ou de n fois 4 groupements glycyles : on discutera plus loin cette constitution.

Formation secondaire d'une substance biurétique insoluble : pentaglycyl-glycine. — L'une des raisons qui m'ont le plus gêné et retardé dans mes recherches pour élucider le mécanisme de condensation du glyocolle au sein de la glycérine, est le fait d'une réaction secondaire, extrêmement intéressante, que subit la triglycyl-glycine au cours des manipulations nécessitées par son isolement.

Dans ces recherches, j'évitais de mettre en œuvre des réactifs énergiques, tels que les acides ou les alcalis, capables de compliquer le problème en produisant secondairement des condensations ou des ruptures de chaînes, et je me bornais aux simples agents de dissolution, moins dangereux à cet égard, tels que l'alcool et l'eau.

En particulier, je me contentais de cristallisations fractionnées dans l'eau, pour tenter d'isoler, de l'excès éventuel de glyocolle, et de la cyclo-glycyl-glycine formée, la substance biurétique soluble que je devais ultérieurement reconnaître comme la triglycyl-glycine.

Mais je n'ai pas tardé à m'apercevoir que cette dissolution de la substance biurétique dans l'eau chaude, qui se faisait au début avec facilité dans quelques centimètres cubes, exigeait à chaque redissolution un volume plus considérable, à tel point qu'elle nécessitait finalement des litres d'eau bouillante. Encore ne réussissait-on pas à redissoudre la totalité de la masse, et n'y parvenait-on que par l'addition d'ammoniaque à l'eau bouillante.

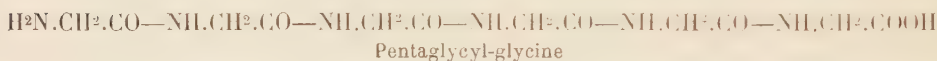
Il m'a donc fallu conclure que par le séjour en solution aqueuse chaude, la substance biurétique soluble se transforme peu à peu en une autre *substance biurétique insoluble* ou si difficilement soluble qu'on peut la considérer comme pratiquement insoluble. Cette substance est, disons-nous, biurétique elle aussi, car lorsqu'on a réussi à la redissoudre par addition d'un peu d'ammoniaque à l'eau bouillante, l'addition d'une trace d'un composé cuivrique développe une magnifique coloration rose-carmin, comme dans le cas de la substance biurétique soluble. Or la substance insoluble n'a pas été altérée dans sa constitution par le fait de la dissolution à l'aide de l'ammoniaque, car la neutralisation par l'acide acétique la reprécipite inaltérée, en épais flocons blancs amorphes, précipitation qui rappelle à s'y méprendre celle de la caséine et d'autres protéides naturels.

Lorsque, dans les tentatives d'isolement de la substance biurétique soluble (triglycyl-glycine), on éliminait par filtration la substance rebelle à la dissolution, et qu'on avait ainsi obtenu une solution chaude bien limpide dont on espérait enfin rester maître, il suffisait de maintenir chaude pendant quelque temps cette solution limpide, pour y voir naître et s'accroître peu à peu les flocons blancs de substance biurétique insoluble, comme si l'on assistait à la coagulation d'un liquide albumineux.

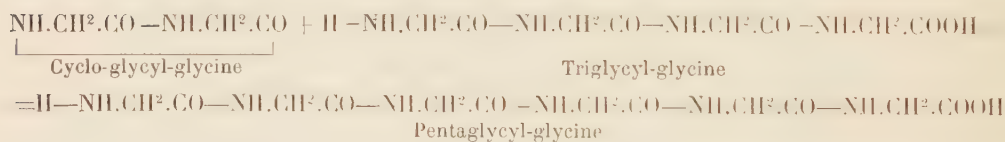
Cependant je me suis aperçu que ce processus d'insolubilisation n'était pas illimité, et qu'après avoir répété un assez grand nombre de fois la redissolution de la masse biurétique et l'élimination par le filtre des flocons indissous, on pouvait, dans certains cas, conserver encore une solution bien limpide fortement biurétique, ne donnant plus de flocons insolubles par séjour sur le bain-marie bouillant. Or j'ai remarqué qu'à ce moment la solution avait cessé de renfermer de la cyclo-glycyl-glycine (2.3. diacipipérazine), dont il était désormais impossible d'extraire la moindre parcelle par fractionnement, soit dans l'eau, soit dans l'alcool à divers degrés de concentration. Au contraire, tant que les solutions biurétiques étaient susceptibles de coagulation, il suffisait de les précipiter par 3-4 volumes d'alcool fort. et d'évaporer l'alcool

surnageant, pour en obtenir des cristaux de cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine).

Il fallait donc penser que la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) intervenait de quelque manière dans la transformation de la substance biurétique soluble (triglycyl-glycine) en substance biurétique insoluble. La première idée qui se présente à l'esprit est celle d'une combinaison-molécule à molécule, conduit à envisager la possibilité d'une association de 6 groupements glycyliques, 4 d'entre eux étant apportés par la triglycyl-glycine, et les 2 autres par la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine). Or, lorsque l'expérience acquise dans ces manipulations m'a permis de préparer à l'état de pureté parfaite des échantillons suffisants de la substance biurétique insoluble, les analyses centésimales m'ont fourni précisément, et avec rigueur, les chiffres répondant à un hexapeptide, la *pentaglycyl-glycine* :



On doit donc admettre que, en présence de la triglycyl-glycine, l'ébullition de la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) au sein de l'eau détermine l'ouverture de l'anneau, et que la chaîne diglycylique ainsi libérée s'unit avec la chaîne tétrapeptidique de la triglycyl-glycine, d'après le schéma suivant :



La condensation aurait lieu ici, sans déshydratation, par addition directe. Nous discuterons plus loin cette question.

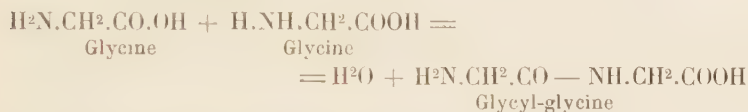
Les caractères de la pentaglycyl-glycine formée seront décrits ultérieurement.

Recherche de la glycyl-glycine au début de la condensation. — La condensation du glycolle au sein de la glycérine se poursuit donc, comme on l'aperçoit déjà, et comme j'en donnerai par la suite la démonstration quantitative, suivant deux modes simultanés. L'un, fondamental au point de vue quantitatif, aboutit à l'anhydride cyclique bimoléculaire (2.5. diacipipérazine), puis à la matière

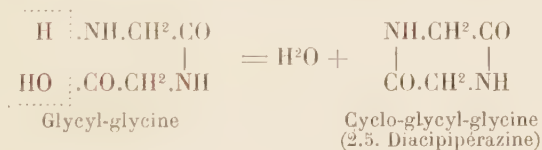
brune. L'autre, secondaire au point de vue quantitatif, mais fort intéressant au point de vue mécanique en même temps que par les suggestions précieuses qu'il offre à la chimie biologique, passe par un peptide tétraglycylique en chaîne ouverte, la triglycyl-glycine, pour aboutir à un anhydride complet à cycle tétraglycylique ou octoglycylique, l'anhydride « corné ».

Je me suis donc demandé si la diacipipérazine et la triglycyl-glycine étaient bien respectivement, chacune pour sa série, le produit de condensation initial, dérivant sans intermédiaire du glycolle lui-même, ou si elles ne seraient pas précédées l'une et l'autre d'un intermédiaire, qui pourrait être le même pour les deux séries, la *glycyl-glycine*.

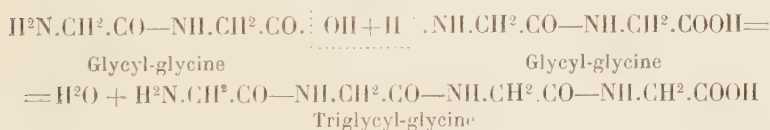
S'il en était ainsi, il y aurait donc d'abord union de 2 molécules de glycine, par perte de H^2O , en une molécule de glycyl-glycine :



Puis la glycyl-glycine subirait à son tour une condensation. Dans le cas d'une anhydrisation endogène, la molécule de la glycyl-glycine se cycliserait en formant la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) :



Si au contraire la glycyl-glycine subissait une condensation par anhydrisation exogène, empruntant à une autre molécule de glycyl-glycine une partie de la molécule d'eau éliminée, il se formerait la triglycyl-glycine :



Pour élucider dans tous ses détails, et dès ses débuts, le mécanisme de la réaction, il était donc intéressant de chercher si l'on pourrait révéler l'existence transitoire de la glycyl-glycine dans les premières phases de cette réaction. On verra plus loin que cette recherche n'a donné jusqu'ici aucun résultat positif.

Difficultés d'isolement et d'étude des produits de la réaction. — La séparation des divers produits de la réaction se trouve donc compliquée par des conditions d'instabilité, qui laissent évoluer des réactions secondaires au cours des fractionnements, même lorsqu'on n'emploie d'autres réactifs que l'alcool et l'eau. Il est assez délicat d'obtenir à l'état de pureté parfaite des échantillons de ces diverses substances, dont certaines ont tendance à se transformer les unes dans les autres au cours même de la préparation : on risque d'aboutir à des échantillons mêlés d'une proportion plus ou moins forte des substances voisines.

Cependant l'étude de ces substances exige des échantillons d'une pureté très rigoureuse. Même quand on est en possession de ces échantillons purs, il faut demander aux analyses le maximum de précision dont soient capables les méthodes actuelles, car lorsqu'on étudie l'enchaînement progressif des molécules de glycine, dès qu'on s'élève un peu dans la série la composition centésimale des chaînes glycyliques ne présente d'un terme à l'autre que des variations extrêmement faibles. Une erreur minime dans la détermination du carbone ou de l'azote, et qui serait parfaitement acceptable dans d'autres recherches, ne saurait être tolérée ici, parce qu'elle atteindrait très vite une grandeur suffisante pour induire en erreur sur le rang du corps étudié dans la série des condensations successives. Il suffit pour s'en rendre compte de jeter un coup d'œil sur le tableau suivant :

Enchaînement progressif des molécules de glycine. Composition centésimale des divers termes :

Termes successifs	Poids moléculaire	C 0/0	H 0/0	N 0/0
1. Glycine.	M = 75	32,00	6,67	18,67
2. Glycyl-glycine	M = 132	36,36	6,06	21,21
3. Diglycyl-glycine	M = 189	38,10	5,82	22,22
4. Triglycyl-glycine	M = 246	39,02	5,69	22,76
5. Tétraglycyl-glycine	M = 303	39,60	5,61	23,10
6. Pentaglycyl-glycine.	M = 360	40,00	5,56	23,33
7. Hexaglycyl-glycine	M = 417	40,29	5,52	23,50
8. Heptaglycyl-glycine.	M = 474	40,51	5,49	23,63
.....				
n. Cyclo-glycyl-glycines	M = (114) ⁿ	42,11	5,26	24,56
(2,5-diacipipérazine)				
anhydride « corné »)				
etc., etc.				

On peut voir par exemple, qu'en passant de l'heptapeptide à l'octopeptide, on n'a plus qu'une variation de 0,22 0/0 en carbone et de 0,13 0/0 en azote, c'est-à-dire que l'analyse centésimale doit ici s'avouer impuissante à déterminer la formule. Pour les termes moins élevés, elle peut encore rendre des services, mais à la double condition d'être très précise, et de porter sur des corps purs. La présence possible d'une petite proportion d'homologues étrangers crée donc de grandes difficultés.

D'autre part, les corps biurétiques dont il s'agit ne se forment qu'en petite quantité, et la réunion d'échantillons suffisants pour l'étude est assez longue.

Le caractère amorphe et colloïde de certains d'entre eux, le volume considérable qu'occupe un poids insignifiant de flocons précipités, sont peu faits pour faciliter les purifications et autres manipulations.

La tenacité avec laquelle ces polypeptides retiennent l'eau oblige à prêter une attention particulière à leur dessiccation en vue de l'analyse. Enfin cette analyse elle-même n'est pas commode, à cause de la résistance des corps à la combustion : dans le dosage du carbone on arrive, grâce au courant d'oxygène, à détruire la totalité de la substance et à obtenir des chiffres satisfaisants ; mais dans le dosage de l'azote par la méthode Dumas, on a souvent de petits déficits d'azote, dus à la destruction incomplète de quelques parcelles, malgré le soin apporté à répartir très finement la substance dans une longue colonne d'oxyde de cuivre.

Pour ces diverses raisons, il a fallu un temps assez considérable, et un assez grand nombre d'expériences préliminaires, avant de posséder la solution du problème et d'en établir les divers points sur des bases définitives.

En présence des divers produits de condensation du glycocolle, j'ai tenu à déterminer leur constitution par des considérations purement intrinsèques, indépendamment de toute idée préconçue et de toute analogie puisée dans les documents bibliographiques. Or il s'est trouvé que l'une de ces substances, la triglycyl-glycine, est précisément identique au tétrapeptide qui sert de substratum à une substance très intéressante découverte dès 1883 par TH. CURTIUS (1) et dont la nature l'a longtemps intrigué.

TH. CURTIUS (1) avait constaté que le glycinate d'éthyle libéré de son chlorhydrate s'altère très rapidement, surtout en présence d'un peu d'eau, et se transforme en deux corps dont l'un est l'anhydride du gly-

1. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol. Vorläufige Mittheilung (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883).

cocolle (2.5. diacipipérazine), l'autre un corps basique fournissant avec une intensité remarquable la réaction du biuret. Mais la nature de cette base biurétique, « Biurethbase », n'avait pu être déterminée, ni par TH. CURTIUS (1) en 1883, ni par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (2) en 1888, ni par L. LILIENFELD (3) en 1894, ni par M. SCHWARZSCHILD (4) en 1903 ; et c'est seulement en 1904, 21 ans après la découverte du corps, que TH. CURTIUS (5) réussit à reconnaître la constitution de sa « Biurethbase ». Elle n'est autre que le *triglycyl-glycinate d'éthyle* :



Base biurétique de Curtius

Triglycyl-glycinate d'éthyle

Encore l'auteur n'est-il parvenu à établir cette constitution qu'au prix de « recherches souvent très pénibles et délicates » et grâce à « l'habileté expérimentale distinguée » de son assistant O. GUMLICH (6).

La base biurétique de TH. CURTIUS est donc l'éther éthylique de cette triglycyl-glycine que j'ai moi-même découverte à l'état libre dans les produits d'anhydriation du glycocolle : les difficultés que j'ai rencontrées dans l'étude de la triglycyl-glycine sont du même ordre que celles auxquelles s'est heurté TH. CURTIUS au sujet de sa base.

En outre, en étudiant la « Biurethbase », TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (7), de même que L. LILIENFELD (8), ont eu entre les mains les *flocons amorphes et gélatineux d'une substance insoluble* formée par altération

1. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol (Vorläufige Mittheilung). *Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883).

2. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N.F., 37, 150, 1888).

3. L. LILIENFELD. Ueber proteinähnliche Substanzen (*Dubois-Reymond's Archiv f. Physiol.*, 1894, 383). — L. LILIENFELD (u. A. WOLKOWICZ). Zur Chemie der Eiweisskörper (*Dubois-Reymond's Archiv f. Physiol.*, 1894, 555).

4. M. SCHWARZSCHILD. Ueber die Wirkungsweise des Trypsins (*Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 4, 155, 1903).

5. TH. CURTIUS (u. O. GUMLICH). Ueber die freiwillige Zersetzung des Glycocollesters (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1284, 1904).

6. « Die Ausführung aller in dieser Abhandlung beschriebenen, oft sehr mühsamen und empfindlichen Versuche verdanke ich der ausgezeichneten Experimentirkunst meines Assistenten, des Hrn. Dr. O. Gumlich » (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1300, 1904).

7. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N.F., 37, 150, 1888).

8. L. LILIENFELD. Ueber proteinähnliche Substanzen (*Dubois-Reymond's Archiv f. Physiol.*, 1894, 383). — L. LILIENFELD (u. A. WOLKOWICZ). Zur Chemie des Eiweisskörper (*Dubois-Reymond's Archiv f. Physiol.*, 1894, 555).

de la Biurethbase au sein de ses solutions, et où l'on reconnaîtra la pentaglycyl-glycine caractérisée par moi comme produit d'une combinaison secondaire de la triglycyl-glycine avec la 2.5. diacépipérazine. Or ces savants n'avaient pu apporter aucun éclaircissement sur la nature de cette substance : peut-être avaient-ils reculé devant les difficultés pratiques de son étude.

Enfin E. FISCHER lui aussi s'est heurté à des difficultés techniques sérieuses lorsqu'il a rencontré les polypeptides que j'ai moi-même retrouvés par ma méthode personnelle. C'est en 1904 qu'il a observé (1) la condensation du diglycyl-glycinate d'éthyle : si l'on chauffe à 110° pendant plusieurs heures cet éther de tripeptide, une notable partie se transforme en produits plus compliqués qui donnent la réaction du biuret. « Malheureusement, écrit E. FISCHER (2), leur purification était assez pénible, et exigeait tant de matériel que j'ai dû remettre à plus tard leur étude approfondie ». Ce n'est que deux ans plus tard (2) qu'il a pu élucider la question par l'emploi de l'éther *méthylque* de la diglycyl-glycine, plus propice que l'éther éthylique, et trouver parmi les produits de condensation la pentaglycyl-glycine.

L'opinion de E. FISCHER sur le triglycyl-glycinate d'éthyle (Biurethbase de TH. CURTIUS) n'a d'ailleurs pas été plus facile à fixer. En 1903, au moment où M. SCHWARZSCHILD (3) venait d'étudier l'action de la trypsine sur la Biurethbase, on voit E. FISCHER et P. BERGELL (4) écrire textuellement : « Qu'une substance de ce genre... soit constituée d'une manière analogue aux substances protéiques et aux peptones, nous ne le tenons pas un seul instant pour vraisemblable. En tous cas sa structure n'est rien moins qu'expliquée, et puisque la glycylglycine, comme nous l'avons montré ci-dessus, n'est pas dédoublée par la trypsine, cette circonstance parle justement plutôt pour une différence structurale entre les polypeptides et la base de CURTIUS. » C'est en 1906 seulement que E. FISCHER (5), après avoir préparé facilement en état de pureté le triglycyl-glycinate de méthyle, a pu se convaincre définitive-

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. II (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 2486, 1904).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. III (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 453, 1906).

3. M. SCHWARZSCHILD. Ueber die Wirkungsweise des Trypsins (*Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 4, 455, 1903).

4. E. FISCHER u. P. BERGELL. Ueber die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2592, 1903).

5. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 2893, 1906).

ment de l'identité de la base de TH. CURTIUS avec le triglycyl-glycinate d'éthyle, qui toutefois est stable à 100° et ne saurait fournir à lui seul la substance amorphe obtenue par TH. CURTIUS dans le chauffage de ses échantillons incomplètement purs.

Si l'on songe au temps et au labeur qu'a coûtés l'identification de la base de TH. CURTIUS, équivalente à la triglycyl-glycine déterminée par moi ; si l'on songe que les flocons amorphes identiques à ma pentaglycyl-glycine n'avaient pu être identifiés par les chimistes qui les avaient vus avant moi ; si l'on songe aux embarras et aux hésitations du maître E. FISCHER ; si l'on songe qu'après la séparation et l'étude des corps mélangés intimement, il m'a fallu mesurer quantitativement la marche horaire des diverses réactions de passage des uns aux autres : peut-être voudra-t-on bien penser que les résultats actuels de mon travail, pour simples qu'ils puissent être en apparence, n'en ont pas moins exigé, pour leur acquisition et leur établissement sur des preuves solides, un temps assez considérable. De là vient que leur publication ne peut voir le jour qu'après un certain nombre d'années de recherches.

Mon intention n'est point de relater ici toute la série des expériences successives par lesquelles j'ai pu élucider peu à peu les divers points du problème. J'indiquerai seulement, dans les chapitres qui vont suivre, les procédés qui permettent, à l'heure actuelle, d'isoler assez facilement les différents produits, primaires ou secondaires, de la condensation du glycoecolle par chauffage au sein de la glycérine, ainsi que les déterminations par lesquelles j'ai établi l'identité de ces substances et leurs principales propriétés.

CHAPITRE II

PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE : CYCLO-GLYCYL-GLYCINE (2.5.diacipipérazine)

Préparation de la Cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine). — La préparation de la cyclo-glycyl-glycine est devenue très facile par mon procédé, plus simple que les procédés antérieurs, tout au moins si l'on dispose, comme point de départ, du glyocolle lui-même.

Jusqu'à présent il fallait toujours commencer par éthérifier le glyocolle, en le mettant en suspension dans l'alcool absolu et saturant le liquide par un courant prolongé de HCl gazeux, ce qui donne le chlorhydrate de glycinate d'éthyle $\text{HCl.NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO.OC}^2\text{H}^5$. C'est à partir de ce chlorhydrate qu'on préparait la 2.5.diacipipérazine, et le meilleur rendement, d'après TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (1), était fourni par le procédé suivant : « On ajoute la quantité calculée d'oxyde d'argent à une dissolution aqueuse modérément concentrée de chlorhydrate d'ester éthylique ou méthylique de glycine, on agite jusqu'à ce que la séparation du chlorure d'argent soit terminée, et on laisse reposer le tout 24 heures. L'eau et le chlorure d'argent sont alors remplis d'une épaisse bouillie de tablettes de glycineanhydride. On filtre et on extrait par l'eau chaude l'anhydride mêlé au chlorure d'argent, sans faire trop bouillir, parce que la substance est retransformée en glyocolle, d'une façon très progressive, par l'ébullition prolongée avec de l'eau. Du filtrat refroidi, l'anhydride se sépare tout à fait pur ».

On pouvait aussi obtenir, bien qu'avec des rendements moins bons (TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (1), l'anhydride, qui se dépose en tablettes lorsqu'on abandonne pendant quelques jours, avec 4 fois son volume

1. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N.F., 37, 450, 1888).

d'eau, le glycinate d'éthyle préalablement libéré de son chlorhydrate par l'oxyde d'argent et tout fraîchement distillé.

Enfin c'est aussi en partant de l'éther préalablement libéré du chlorhydrate, qu'opèrent E. FISCHER et E. FOURNEAU (1), qui additionnent 100 gr. de glycinate d'éthyle de 60 gr. d'eau, en refroidissant, et abandonnent le mélange pendant 1-2 jours à la température du laboratoire. L'anhydride se dépose sous forme d'une belle masse cristalline. Mais il a fallu d'abord libérer le glycinate d'éthyle de son chlorhydrate, en additionnant de soude caustique et de carbonate de potassium la solution concentrée, énergiquement refroidie, du chlorhydrate, puis extraire, par agitation répétées avec de l'éther, le glycinate d'éthyle libéré, dessécher la solution éthérée, chasser l'éther-véhicule par distillation, peut-être même distiller le glycinate d'éthyle lui-même.

Le rendement dans le passage du glycinate d'éthyle à l'anhydride étant de 67 0/0 environ, et voisin de 70-80 0/0 dans l'extraction du glycinate d'éthyle de son chlorhydrate, on voit qu'à partir du glycolle, en supposant qu'il n'y ait aucune perte dans la formation du chlorhydrate de glycinate d'éthyle, le rendement final après la série des trois opérations ne peut dépasser 50 0/0.

Telles étaient du moins les circonstances de préparation de la 2.5. diacipipérazine suivant la technique de E. FISCHER et E. FOURNEAU, et à l'époque où j'ai moi-même imaginé mon procédé à la glycérine. Depuis lors, et pendant les très longs délais qu'a exigé de moi, avant toute publication, l'étude des condensations supérieures du glycolle, E. FISCHER (2) a fait connaître une nouvelle technique très simplifiée, et que voici textuellement :

« Au lieu d'isoler l'ester du glycolle puis de l'abandonner à la condensation en solution aqueuse concentrée, on peut aussi décomposer le chlorhydrate de glycollate d'éthyle en solution aqueuse, en prenant à peu près la quantité calculée de soude, parce que dans ces conditions il se produit une transformation assez simple de l'ester en anhydride.

« 560 gr. sont placés dans un becher à parois épaisses, avec 280 cc. d'eau. Le mélange est bien refroidi dans un mélange réfrigérant, et tout en agitant énergiquement on ajoute goutte à goutte 320 cc. de

1. E. FISCHER u. E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 2893, 1906). Voir p. 2930-2931.

soude 11,5 fois normale, en l'espace de quelques heures, et de telle sorte que la température ne s'élève jamais au-dessus de 5°. Le chlorhydrate d'ester tout entier passe peu à peu en solution, tandis qu'il se précipite un peu de NaCl. La quantité de soude doit être un peu inférieure à celle qui serait nécessaire pour fixer la totalité de HCl contenu dans le chlorhydrate. Après que la soude a été introduite tout entière, on laisse le liquide reposer à température ordinaire. Après quelques heures déjà commence le dépôt de l'anhydride, et régulièrement la réaction est terminée après 24 heures. On refroidit alors fortement, on filtre à la pompe, on presse, et on élimine NaCl par lavage avec le moins possible d'eau glacée. Le produit brut est recristallisé une fois dans 6 fois son poids d'eau chaude avec addition de noir animal. Le rendement atteint 90-100 gr. ; il est ainsi aussi bon que dans le procédé précédemment décrit, qui est plus aléatoire. Le glycinanhydride pur ne doit plus du tout montrer la réaction du biuret : si celle-ci existe encore, il faut à nouveau recristalliser dans l'eau ».

Or mon procédé n'exige qu'une seule transformation au lieu de trois, et peut donner un rendement de 70-80 0/0 par rapport à la théorie, à partir du glycocolle.

Lorsqu'on veut obtenir la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) pure le plus simplement possible, et sans avoir à se préoccuper de l'élimination d'une trace de triglycyl-glycine éventuelle (le procédé au glycinate d'éthyle introduit lui aussi dans le produit un peu de triglycyl-glycinate d'éthyle), on opère ainsi. Le glycocolle placé dans un vase cylindrique est dissous dans le minimum d'eau bouillante, puis additionné d'un excès (1) de bonne glycérine pure du commerce, et le vase est placé dans une étuve à air. On chauffe l'étuve et on maintient ensuite sa température entre 170° et 175°, soit à l'aide d'un régulateur automatique, soit tout simplement en manœuvrant de temps en temps le robinet de gaz, ce qui ne demande qu'une surveillance insignifiante. À partir du moment où le mélange a pris une teinte brun-noir accentuée, on le maintient encore à 170°-175° pendant une ou plusieurs heures, temps qui varie naturellement avec la forme du vase, le volume du

1. La plupart des expériences que j'ai faites au cours de ce travail ont comporté l'addition, au glycocolle, de *quatre à six fois* son poids de glycérine à 30°B., mais il ne faut pas entendre que cette proportion soit définitive, et qu'on ne puisse la réduire, afin de faciliter l'élimination ultérieure de la glycérine par lavages alcooliques. On trouvera plus loin une étude spéciale sur les modifications que la proportion de glycérine introduit dans l'allure de la réaction.

liquide et sa surface. Si l'on veut s'assurer que la triglycyl-glycine formée en petite quantité dans les premières phases de la condensation a maintenant disparu (par cyclisation en anhydride polyglycylique) et ne pourra venir souiller le produit, il suffit d'essayer sur quelques gouttes du mélange sirupeux la réaction du biuret.

Quand toute réaction biurétique a disparu, on laisse refroidir le mélange, qui se prend généralement bientôt en un magma plus ou moins épais, rempli de petits cristaux. On lave ces cristaux avec un peu d'alcool absolu (ou simplement avec de l'alcool à 96°, qu'on décante et renouvelle plusieurs fois. L'alcool dissout la glycérine, et laisse la majeure partie de la cyclo-glycyl-glycine (1). On dissout alors le résidu cristallin dans l'eau bouillante (2), laisse digérer avec un peu de noir animal qui fixe la majeure partie de la matière brune, filtre, concentre au bain-marie jusqu'à cristallisation commençante, et refroidit rapidement en agitant. Les cristaux sont d'emblée presque complètement purs, à part une légère teinte jaunâtre, provenant d'une trace impondérable de matière colorante que les recristallisations dans l'eau éliminent difficilement. Pour avoir tout à fait blancs les cristaux de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine), il convient de les redissoudre dans un peu d'eau bouillante, ajouter 3-4 volumes d'alcool fort, et refroidir en agitant.

On peut obtenir aussi la cyclo-glycyl-glycine en fractionnant les produits de la condensation *incomplète* du glycolle au sein de la glycérine. L'opération est ici plus longue et je ne la recommande pas comme une préparation pratique de la 2.5.diacipipérazine ; elle m'a néanmoins fourni de grandes quantités de ce corps comme produit accessoire de mes recherches sur la triglycyl-glycine. Lorsque le mélange chauffé est retiré de l'étuve avant que la coloration brune ait atteint tout à fait son maximum, il donne avec intensité la réaction du biuret, due à la triglycyl-glycine. On commence par délayer le magma glycérique dans

1. Il arrive souvent que les lavages alcooliques, réunis, laissent cristalliser, surtout lorsqu'on les laisse séjourner au froid, encore une certaine fraction de la cyclo-glycyl-glycine, qui était restée dissoute dans la glycérine. Ces cristaux, très purs, peuvent être utilement recueillis et lavés rapidement à l'alcool.

2. Il ne faut pas chercher à obtenir ici une solution limpide, à cause des parcelles insolubles d'anhydride polyglycylique (provenant de la cyclisation de la triglycyl-glycine) qui restent en suspension. On s'aperçoit aisément que la partie fondamentale, cristalline, est dissoute, et l'on peut, ou bien séparer l'anhydride polyglycylique par centrifugation, ou, si l'on ne désire pas le recueillir, ajouter immédiatement le noir animal.

l'alcool fort, qu'on ajoute en assez grande quantité tant que cette addition continue à donner un trouble ; puis on laisse reposer. La solution alcoolique de glycérine est décantée, et le dépôt est de nouveau lavé dans un peu d'alcool neuf. Si l'on dissout alors le dépôt dans le minimum d'eau chaude, et qu'on ajoute 3-4 volumes d'alcool à 96°, la triglycyl-glycine se précipite en presque totalité, avec une grande partie de la cyclo-glycyl-glycine, mais une quantité appréciable de cette dernière reste dissoute dans le liquide alcoolique. Il en est de même si on laisse digérer directement, pour moins altérer la triglycyl-glycine, le mélange avec de l'alcool à 75°-80°, qui dissout un peu de 2.5.diacipipérazine. Après un certain nombre de traitements à l'alcool faible, la totalité de la cyclo-glycyl-glycine a passé dans les lavages.

La distillation des liquides alcooliques de lavage abandonne la cyclo-glycyl-glycine presque pure, souillée seulement d'un peu de triglycyl-glycine qui n'était pas rigoureusement insoluble dans l'alcool faible, mais qui n'existe qu'en quantité si minime qu'elle reste facilement dans les eaux-mères lorsqu'on recristallise dans l'eau la 2.5.diacipipérazine. Celle-ci est en cristaux d'un blanc de neige.

Propriétés de la cyclo-glycyl-glycine. — La substance isolée dans mes recherches est obtenue en petits cristaux par cristallisation rapide de la solution aqueuse ; l'évaporation lente abandonne les tablettes plates décrites par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (1). Précipitée par addition d'alcool à la solution aqueuse, elle est habituellement en petits cristaux aciculaires ; sublimée, elle se condense en petites aiguilles extrêmement fines d'un blanc de neige.

Chauffée sur le bloc Maquenne, elle commence à montrer des indices de décomposition dès 210°-220°, et brunit peu à peu. A 250° elle noircit nettement, et vers 260° elle disparaît en donnant des vapeurs blanches et un sublimé de fines aiguilles, mais elle ne fond pas. Chauffée rapidement dans un petit tube ou sur la lame de platine, la substance fond en un liquide incolore, puis charbonne en partie en donnant les vapeurs blanches et le sublimé. Il reste un charbon assez résistant, léger et volumineux, mais moins boursoufflé cependant que celui du glyocolle. Les vapeurs de la cyclo-glycyl-glycine ont une odeur aromatique particulière, qui rappelle celle de la pyridine mais s'en distingue nettement et se reconnaît aisément.

La cyclo-glycyl-glycine est facilement soluble dans l'eau chaude, mais

1. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 37, 450, 1888).

beaucoup moins dans l'eau froide. Elle est presque insoluble dans l'alcool fort, et une solution aqueuse concentrée précipite d'abondants cristaux lorsqu'on l'additionne d'alcool; cependant, dans ces conditions, la liqueur alcoolique faible (70°-80°) conserve en solution une quantité de cyclo-glycyl-glycine de l'ordre de 5-10 grammes par litre environ.

La solution aqueuse est neutre au tournesol. Elle ne donne pas la réaction du biuret, et à l'ébullition ne dissout pas trace d'oxyde de cuivre précipité et lavé, ceci conformément aux données de TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (1), et de L. BALBIANO (2). Si l'on rencontre dans la littérature une indication (E. FISCHER et E. FOURNEAU (3) d'après laquelle on pourrait croire que la cyclo-glycyl-glycine dissout une trace d'oxyde de cuivre (4), cette indication n'est pas exacte et se rapporte évidemment à un échantillon de 2.5. diacipipérazine insuffisamment purifié. Il contenait certainement, soit une trace de glyocolle ou de glycyl-glycine formés par hydrolyse, soit un peu de base biurétique provenant de sa préparation.

En faisant bouillir un petit échantillon du corps cristallisé obtenu par anhydriisation au sein de la glycérine, pendant un quart d'heure avec H_2SO_4 à 5 0/0, puis en présence d'un léger excès de BaCO_3 , et filtrant chaud, on obtient une solution qui dissout maintenant en abondance l'oxyde de cuivre. Le liquide bleu foncé fournit, par concentration ou par addition d'alcool, les aiguilles bleues du glycollate de cuivre. Il s'agissait donc bien d'un anhydride du glycollate: l'hydrolyse a régénéré l'acide aminé.

Analyse centésimale.— L'analyse centésimale donne des chiffres concordant avec la formule $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$.

I. — Substance : 0 gr. 2541. — CO_2 : 0 gr. 3893 — H_2O : 0 gr. 4307 — $\text{C} = 41,79$ 0/0 — $\text{H} = 5,71$ 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 2758. — CO_2 : 0 gr. 4264 — H_2O : 0 gr. 4384 — $\text{C} = 42,17$ 0/0 — $\text{H} = 5,58$ 0/0.

1. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocolläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 37, 450, 1888).

2. L. BALBIANO. Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, I, 410, 1902).

3. E. FISCHER u. E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

4. «... kocht man die wässrige Lösung des letzteren [Glycinanhydrids] mit gefälltem Kupferoxyd etwa 1/2 Minute, so ist das Filtrat kaum gefärbt » (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, p. 2872, 1901).

III. — Substance : 0 gr. 1576. — Méth. Dumas. N² dégagé : 33 cc. 0 à 15° et 747 mm. (15°5) = 38 mgr. 6954. — N = 24,53 0/0.

IV. — Substance : 0 gr. 1025. — Méth. Dumas. N² dégagé : 21 cc. 7 à 16° et 760,7 mm. (19°) = 25 mgr. 1329. — N = 24,52 0/0.

V. — Substance : 0 gr. 1390. — Méthode Kjehldahl. NH³ quart-normal recueilli : 9 cc. 88, contenant 0 gr. 03458 N. — N = 24,88 0/0.

VI. — Substance : 0 gr. 1410. — Méthode Kjehldahl. NH³ quart-normal recueilli : 9 cc. 98, contenant 0 gr. 03493 N. — N = 24,77 0/0.

THÉORIE pour C ⁴ H ⁶ N ² O ²		ANALYSE					
		I	II	III	IV	V	VI
C = 48	42,44	44,79	42,17	—	—	—	—
H = 6	5,26	5,71	5,58	—	—	—	—
N = 28	24,56	—	—	24,55	24,52	24,88	24,77
O = 32	—	—	—	—	—	—	—
C ⁴ H ⁶ N ² O ² = 114	100,00						

On remarquera que malgré l'identification indiscutable du corps, et malgré les excellents chiffres d'azote fournis par la méthode Dumas, j'ai tenu à faire figurer ici deux déterminations d'azote par la méthode Kjehldahl, exécutées sur le même échantillon que les dosages précédents. Mon but était d'être renseigné sur la valeur comparative des deux méthodes dans les conditions de mes analyses. On voit que, pour la cyclo-glycyl-glycine, bien que la méthode Kjehldahl donne des chiffres un peu plus forts, l'écart maximum entre le chiffre le plus fort de la méthode Kjehldahl et le plus faible de la méthode Dumas n'est que 0,36 0/0. L'écart des moyennes n'est que 0,29 0/0.

Ce contrôle est fort important; il a été fait le même jour, par la même opérateur, avec les mêmes appareils et les mêmes solutions titrées que pour d'autres corps (triglycyl-glycine, pentaglycyl-glycine). Or on verra plus loin que pour ces corps, l'écart entre les deux méthodes atteint facilement 1 0/0 et doit alors être attribué à une insuffisance de la méthode Dumas vis-à-vis de certains corps difficilement combustibles et non volatils. Cette constatation sera d'une importance capitale pour la détermination des formules de la triglycyl-glycine et de la pentaglycyl-glycine.

Pour des raisons du même ordre, j'ai encore exécuté un contrôle consistant à doser l'azote par la méthode Dumas dans la cyclo-glycyl-glycine intégralement ramenée à l'état de glyocolle par une hydrolyse

complète. La prise d'essai (0 gr. 1003) est placée dans une capsule de platine avec 15 cc. d'eau et 5 cc. d'acide chlorhydrique pur des réactifs, puis la capsule est abandonnée sur le bain-marie jusqu'au moment où l'excès de HCl est tout entier chassé et où la capsule ne dégage plus de vapeurs acides (7 heures 1/2). Le contenu (chlorhydrate de glycocolle) est alors redissous dans quelques gouttes d'eau chaude, et on y verse de l'oxyde de cuivre bien calciné et grossièrement broyé, en quantité suffisante pour absorber tout le liquide. On dessèche dans la capsule même, à l'étuve à 110°, cette masse d'oxyde de cuivre imbibée de glycocolle, et on l'introduit dans le tube à combustion ainsi que de nouvelles portions d'oxyde de cuivre auxquelles on a fait absorber les lavages de la capsule. On conduit le dosage d'azote à la manière ordinaire :

VII. — Substance: 0 gr. 1003. — Méth. Dumas. N² dégagé: 21 cc. 2 à 18° et 758,0 mm. = 24 mgr. 2422. — N = 24,17 0/0.

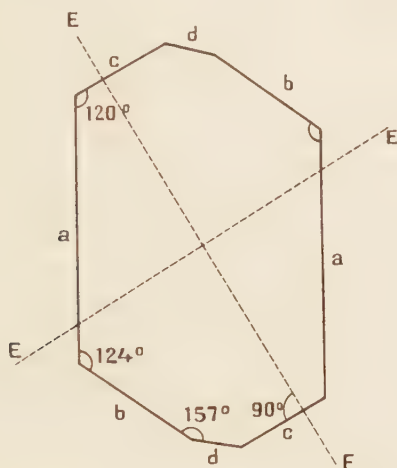
On voit qu'une hydrolyse de ce genre, avec quelques soins, peut être exécutée sans entraîner de pertes notables, et pourra rendre à l'occasion des services, ainsi qu'on le verra dans la suite.

Aspect microscopique de la cyclo-glycyl-glycine. — Au cours du présent travail, j'ai été conduit maintes fois à rechercher rapidement la présence de la cyclo-glycyl-glycine dans un produit de réaction : l'aspect microscopique des cristaux de ce corps m'a rendu des services.

La cyclo-glycyl-glycine se présente sous forme de tablettes plates très minces, dont les contours n'offrent aucune épaisseur apparente, ce qui permet de considérer les faces de contour comme normales au plan de la préparation, et de rapporter vraisemblablement les cristaux au système monoclinique. Sans prétendre faire ici l'étude cristallographique véritable de ces formes, je me bornerai à indiquer leur aspect le plus habituel, avec la valeur approximative des angles que font entre elles les *traces* des faces latérales sur le plan des grandes faces tabulaires, angles dont j'ai tenté la détermination approximative (à 1° près) au moyen d'un oculaire à réticule et d'une platine tournante centrée.

On peut rapporter la face tabulaire à un parallélogramme *a, b, a, b*, d'angles 56° et 124° (environ). La trace d'une troisième face *c*, généralement présente quoique moins développée, fait avec la trace *a* un angle de 120°. Les tablettes présentent de nombreuses traces de clivage suivant les directions *b* et *c*. Enfin on observe souvent la trace *d* d'une

quatrième face, très peu développée, qui fait avec c un angle d'environ 139° , et par conséquent 157° avec b .



Cyclo-glycyl-glycine (Aspect microscopique)

En lumière polarisée l'une des directions d'extinction EE, EE, fait un angle de 30° avec la direction générale d'allongement a du cristal ; elle est normale à la trace c . Ceci corrobore l'hypothèse du système monoclinique.

Il arrive fréquemment que ces larges tablettes soient prolongées par une partie plus rétrécie, une sorte de pédicule qui leur permet de se grouper en bouquets. Enfin, dans beaucoup de préparations on trouve les petits feuillets groupés en grand nombre sous forme de dendrites *foliacées* toujours reconnaissables à la largeur des feuillets élémentaires.

Combinaisons prétendues de la 2.5. diacipipérazine. — On sait que la 2.5. diacipipérazine ne possède pas de caractère basique suffisant pour former avec les acides des sels stables en présence de l'eau ou de l'alcool, ainsi qu'il résulte des travaux de E. FISCHER et E. FOURNEAU (1). Ces auteurs ont montré que le prétendu « chlorhydrate

1. E. FISCHER et E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glykocolls (*Ber. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

de glycinanhydride » obtenu par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (1) en faisant bouillir l'anhydride avec HCl concentré et recristallisant dans l'alcool, n'est pas autre chose que le *chlorhydrate de glycylglycine* $\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH}$: l'action de HCl chaud a provoqué l'ouverture de l'anneau pipérazique. J'ai répété naturellement la même constatation.

De plus, j'ai eu à étudier personnellement la question du chloroplatinate, étant à la recherche de combinaisons cristallisées qui permettent de retrouver et de différencier, par l'observation microscopique, la cyclo-glycyl-glycine, la glycyl-glycine, la triglycyl-glycine, susceptibles de se trouver en mélange dans divers produits de réaction, accompagnées ou non de glycolle, etc. Mes tentatives dans cette voie ont échoué complètement, pour cette raison que je n'ai jamais pu obtenir le moindre chloroplatinate authentique de cyclo-glycyl-glycine, tous les essais fournissant au contraire, avec la plus grande facilité, le *chloroplatinate de glycyl-glycine* $(\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH})^2 \text{PtCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ainsi qu'on le verra tout à l'heure. Lorsqu'on tente de préparer le chloroplatinate de 2.5.diacipipérazine, l'anneau pipérazique s'ouvre donc comme dans le cas du chlorhydrate.

La crainte d'un résultat du même ordre m'a empêché de poursuivre les essais que j'avais commencés avec l'acide silicoduoatéungstique, dans le but également de trouver des combinaisons cristallisées bien reconnaissables au microscope.

Il ne m'a pas semblé nécessaire, pour le but que je poursuivais, d'étudier la combinaison argentique obtenue par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (2) en ajoutant, à la solution aqueuse du glycinanhydride, du nitrate d'argent, puis de l'ammoniaque avec précaution, combinaison qu'ils décrivent comme de petites aiguilles à peine solubles dans l'eau chaude, et à laquelle ils attribuaient la formule $\text{N} \cdot \text{Ag} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO}$.

Prétendu chloroplatinate de 2.5.diacipipérazine. — La question se posait de savoir si la cyclo-glycyl-glycine (anhydride bimoléculaire, 2.5.diacipipérazine) fournit en réalité un chloroplatinate, ainsi qu'il résulte des descriptions de TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (3) et de L. BALBIANO (4). Etant donné que lorsqu'on tente la formation

1. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocoläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 37, 150, 1888).

2. *Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., t. 37, p. 175.

3. *Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., t. 37, p. 178.

4. L. BALBIANO. Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, I, 410, 1902).

du chlorhydrate, la 2.5.diacipipérazine ouvre son anneau sous l'action hydratante de HCl, on peut se demander s'il n'en est pas de même en ce qui concerne le chloroplatinate, et si, pendant l'action, sur la 2.5. diacipipérazine, de la solution chlorhydrique d'acide chloroplatinique, il ne se produit pas la même ouverture hydrolytique de l'anneau, avec formation du *chloroplatinate de glycyl-glycine* :



Les conditions de la réaction donnent beaucoup de vraisemblance à cette hypothèse. Le prétendu chloroplatinate de glycinanhydride (Salzsaures Glycinanhydrid-Platinchlorid), auquel TH. CURTIUS et FR. GOEBEL assignent la formule $(\text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO})(\text{HCl})^2 \cdot \text{PtCl}^4 + 3\text{H}_2\text{O}$, fut d'abord obtenu par eux en évaporant avec HCl et PtCl^4 une solution aqueuse de Biuretbase (triglycylglycinate d'éthyle). Or si l'on conçoit très bien que l'action prolongée de HCl en solution aqueuse puisse d'abord saponifier l'éther éthylique de la triglycyl-glycine, puis rompre *par hydratation* la molécule de ce tétrapeptide lui-même en deux molécules de glycyl-glycine qui se combineraient à l'acide chloroplatinique, on conçoit beaucoup plus difficilement que l'action de HCl aqueux puisse déterminer l'*anhydrisation* cyclique nécessaire à la formation de la 2.5.diacipipérazine.

Il est vrai qu'ensuite TH. CURTIUS et FR. GOEBEL obtinrent le même sel en additionnant de chlorure de platine une solution de glycinanhydride pur dans HCl dilué ; mais ici encore il faut compter avec l'action de HCl, action qui doit se prolonger sans doute (bien que cela ne soit pas indiqué explicitement dans la rédaction des auteurs) un temps suffisant pour concentrer fortement le sel, assez soluble dans l'eau.

A son tour L. BALBIANO obtint le prétendu chloroplatinate d'anhydride bimoléculaire, auquel il assigna la même formule $[(\text{C}^2\text{H}^3\text{NO}^2)^4, 2\text{HCl}, \text{PtCl}^4, 3\text{H}_2\text{O}]$, en dissolvant à chaud la 2.5.diacipipérazine dans l'eau, ajoutant un léger excès d'une solution chlorhydrique d'acide chloroplatinique, refroidissant, et maintenant la solution dans un exsiccateur. L'ouverture du cycle par HCl est ici fort à craindre.

D'autre part, les chiffres d'analyse publiés pour le prétendu chloroplatinate de glycinanhydride $[(\text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO})(\text{HCl})^2 \text{PtCl}^4 + 3\text{H}_2\text{O}]$ concordent mieux encore avec ceux qu'exigerait la formule d'un chloroplatinate de glycyl-glycine $(\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH})^2 \text{PtCl}^4$ exempt d'eau de cristallisation. Des trois molécules d'eau de cristallisation supposées par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL, deux seraient en réalité de l'eau de constitution appartenant à la molécule même de la glycyl-glycine. Quant à la troisième molécule H_2O , on s'aperçoit que si

TH. CURTIUS et FR. GOEBEL ont dû la faire entrer dans la formule pour obtenir une certaine concordance des chiffres centésimaux, cela résulte peut-être d'une erreur toute fortuite, d'un simple *lapsus calami* qui s'est glissé dans leurs calculs.

En calculant le poids moléculaire correspondant à leur formule (1), ils ont écrit « $\text{Cl}^6 = 203$ » au lieu de $\text{Cl}^6 = 213$, et trouvé par suite un poids moléculaire erroné de 10 par défaut. Il fallait relever ce poids moléculaire pour éviter de trop grands écarts entre la théorie et l'analyse : peut-être est-ce ainsi que TH. CURTIUS et FR. GOEBEL ont été conduits à introduire dans la formule une troisième molécule H^2O , en réalité inexistante (2).

Mais si l'on calcule la composition centésimale du chloroplatinate de *glycyl glycine* exempt d'eau de cristallisation, on trouve des chiffres qui concordent avec les résultats analytiques de TH. CURTIUS et FR. GOEBEL eux-mêmes, mieux encore que les chiffres de leur propre formule.

Calculé pour ($\text{HCl.NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO}—\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOH}$) $^2\text{PtCl}^4$			Trouvé par CURTIUS et GOEBEL		Calculé par CURTIUS et GOEBEL pour leur formule
C ⁸	96	14,24	13,60	—	13,83
H ¹⁸	18	2,67	3,23	—	2,88
Cl ⁶	213	31,60	31,41	—	30,83
N ⁴	56	8,31	8,36	—	8,07
O ⁶	96	14,25	15,27	—	16,00
Pt	195	28,93	28,13	27,19	28,39
	674	100,00			

On voit que pour le platine les chiffres analytiques ne concordent très étroitement avec aucune des deux formules ; en revanche, pour l'azote et pour le chlore, ils concordent mieux avec le chloroplatinate de glycyl-glycine, calculé sans eau de cristallisation.

Il est vrai que TH. CURTIUS et FR. GOEBEL pensent avoir en fait constaté et dosé l'eau de cristallisation. Mais voici ce qu'ils disent : « L'eau de cristallisation ne s'échappe complètement que vers 130°, tandis que la substance se colore en même temps en brun doré. Peu au-dessus

1. *Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., t. 37, p. 178.

2. Cependant les teneurs centésimales semblent avoir été calculées pour le poids moléculaire 694 qui répond authentiquement à la formule de TH. CURTIUS et FR. GOEBEL.

de cette température a lieu la décomposition complète » (1). Il est permis de se demander si dans ces conditions la perte de poids est bien réellement due à de l'eau *de cristallisation*, et si on ne peut craindre un commencement de décomposition *moléculaire*, débutant par exemple par l'anhydrisation de la glycyl-glycine qui serait présente dans le chloroplatinate. On retrouvera plus loin cette question à propos du chloroplatinate de glycyl-glycine authentique, que j'ai préparé et analysé.

Enfin E. FISCHER et E. FOURNEAU (2) ont constaté déjà la difficulté d'obtenir un chloroplatinate du glycinanhydride : « L'anhydride, disent-ils, est une base si faible que ses sels sont décomposés déjà par l'eau et l'alcool. . . CURTIUS et GOEBEL ont cependant préparé et analysé un chloroplatinate, mais ce sel lui aussi est, comme nous l'avons observé, déjà décomposé par l'eau ».

Essai de préparation du chloroplatinate de cyclo-glycyl-glycine. — Dans un petit vase cylindrique sont placés 2 gr. 5 de cyclo-glycyl-glycine (2,5 diacipipérazine) pure ; on ajoute un peu d'eau bouillante et on maintient au bain-marie en ajoutant encore de l'eau par petites portions, jusqu'à dissolution totale, ce qui exige environ 40 cc. D'autre part, 10 gr. de chlorure de platine ont été dissous dans environ 80 cc. d'alcool absolu, et additionnés de 3 cc. d'acide chlorhydrique. On verse la solution froide de H^2PtCl^6 dans la solution chaude de cyclo-glycyl-glycine, et on plonge aussitôt le vase dans l'eau pour refroidir rapidement.

Au bout de 2 ou 3 minutes commencent à apparaître quelques paillettes cristallines qui augmentent rapidement de nombre. Le vase est alors placé dans la glace pendant 1 heure environ, tandis que l'on agite fréquemment, puis la bouillie cristalline est essorée à la trompe. Or, dès l'écoulement de l'eau-mère, on constate que les cristaux sont blancs et ressemblent aux paillettes de la cyclo-glycyl-glycine elle-même.

Rapidement lavés par suspension dans l'alcool absolu et essorage, les cristaux sont d'un blanc pur et présentent au microscope l'aspect de la cyclo-glycyl-glycine. Dans une capsule de porcelaine, ils brûlent entièrement avec l'odeur caractéristique, et ne laissent pas de résidu de platine ; dissous dans l'eau et chauffés avec un peu d'acide nitrique, ils ne donnent pas trace de précipité par le nitrate d'argent. Ces cris-

1. *Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., t. 37, p. 178.

2. *Ber. d. d. chem. Ges.*, t. 34, p. 2870.

taux sont simplement la cyclo-glycyl-glycine précipitée par l'alcool : elle n'a pas fixé l'acide chloroplatinique.

La cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine), dans ces conditions, ne forme pas de chloroplatinate.

L'expérience a sa contre-partie. Les cristaux de cyclo-glycyl-glycine qui ont été ainsi séparés de la solution chloroplatinique sont redissous dans l'eau chaude, et leur solution étendue d'eau froide jusqu'à un volume tel qu'elle ne cristallise pas par refroidissement; on y ajoute alors l'eau-mère chloroplatinique, et on abandonne le tout dans un large cristalliseur, dans le vide sur H^2SO^4 . Cette fois on n'observe plus la séparation du moindre cristal de cyclo-glycyl-glycine, mais au bout de 2-3 jours on voit apparaître des cristaux rouge-orangé dont certains deviennent énormes (1-2 centimètres de diamètre), et où il est facile de reconnaître les cristaux « gros comme des noisettes » décrits par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (1). Il s'est donc maintenant formé un chloroplatinate après séjour prolongé en milieu chlorhydrique.

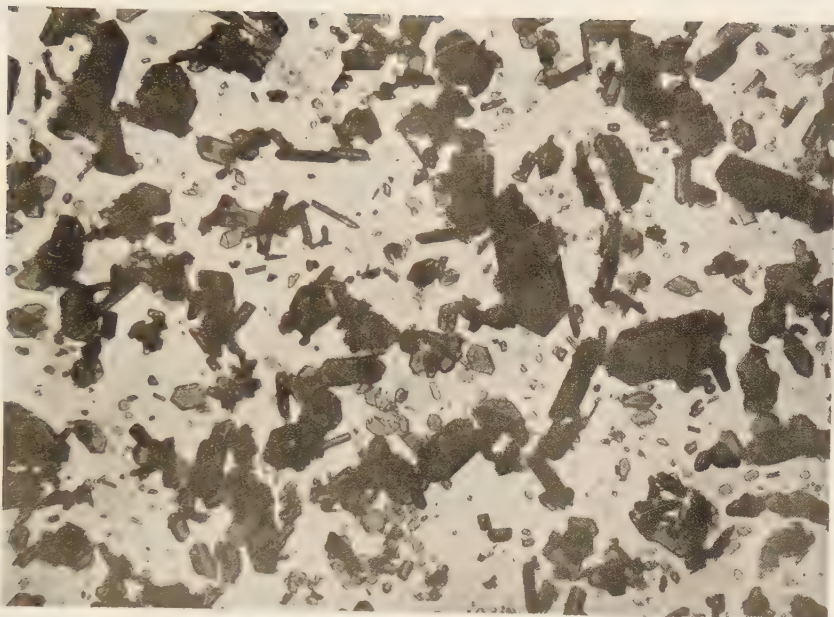
Pour purifier ce chloroplatinate, en vue de son analyse et de sa comparaison avec le chloroplatinate authentique de glycyl-glycine, les gros cristaux sont redissous dans le minimum d'eau bouillante, puis on ajoute aussitôt à la solution 3 volumes d'alcool, et on refroidit dans l'eau glacée. Bientôt apparaissent de fins cristaux qui, au lieu de se présenter en paillettes légères comme la cyclo-glycyl-glycine intacte de la tentative précédente, tombent au fond du vase sous forme d'un sable dur et pesant, de couleur jaune-orangé, ressemblant tout à fait au chloroplatinate de glycyl-glycine.

Dosage de l'eau de cristallisation. — Un échantillon des petits cristaux étant finement pulvérisé et maintenu dans le vide sur H^2SO^4 jusqu'à constance de poids, on en prélève 0 gr. 4117, qui sont portés à l'étuve à 110° , où ils subissent les pertes suivantes :

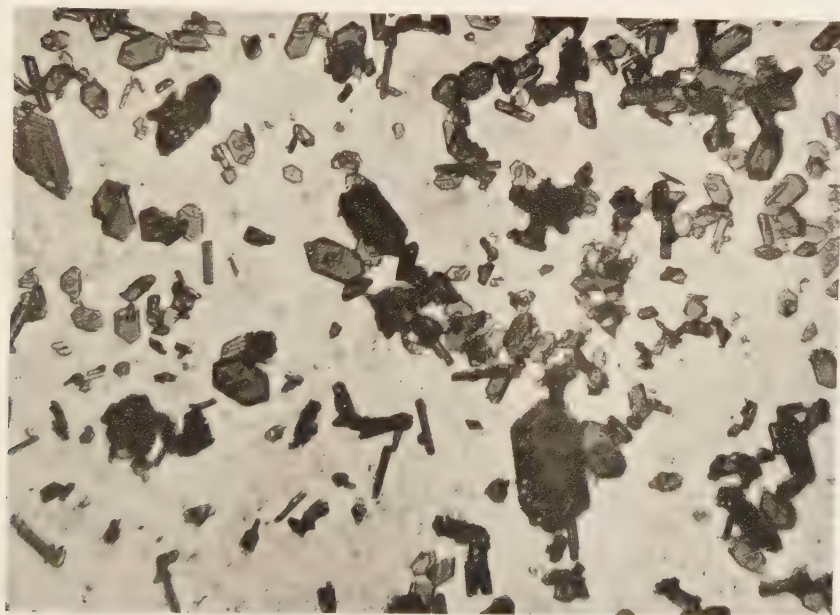
Durée de séjour à 110°	Perte totale	Perte relative
5 heures	0,0224	5,44 0/0
10 heures	0,0224	5,44 0/0

Dosage du platine. — La prise d'essai précédente, qui pesait 0 gr. 4117 et a subi la dessiccation à 110° , est reprise par un peu d'eau chaude dans le vase de verre où elle avait été pesée, transportée dans une cap-

1. *Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., t. 37, p. 178.



D. — Prétendu chloroplatinate de 2,5. diacipérazine.



G. — Chloroplatinate de glycyl-glycine authentique.

sule de platine, évaporée à sec, et calcinée doucement. Résidu de platine : 0 gr. 1125. Teneur en platine : $\text{Pt} = \frac{0,1125 \times 100}{0,4117} = 27,33 \text{ 0/0}$.

Dosage de l'azote. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 2727. — N_2 dégagé : 18 cc. 7 à 20° et 767,0 mm. (23°) = 21 mgr. 4171. — $\text{N} = 7,85 \text{ 0/0}$.

Identité du prétendu chloroplatinate de 2.5.diacipipipérazine avec le chloroplatinate de glycyl-glycine. — On verra dans le chapitre suivant que j'ai préparé, dans un but de comparaison, et en partant d'un échantillon de glycyl-glycine pure, le chloroplatinate de glycyl-glycine, non encore décrit, auquel les analyses ont assigné la formule :



Les 2 molécules d'eau de cristallisation, qui résistent à la dessiccation dans le vide sur H^2SO^4 , s'échappent à 110°.

Voici la composition centésimale de ce corps, comparée aux chiffres trouvés par moi pour le prétendu chloroplatinate de 2.5. diacipipérazine :

Calculé pour $(\text{HCl.NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOH})^2 \text{PtCl}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	Trouvé
$\text{Pt} = 27,46 \text{ 0/0}$	27,33
$\text{N} = 7,89 \text{ 0/0}$	7,85
$\text{H}_2\text{O} = 5,07 \text{ 0/0}$	5,44

Les chiffres expérimentaux concordent d'une manière très satisfaisante avec la théorie, et, on le verra, avec ceux qu'a fourni l'analyse du chloroplatinate authentique de glycyl-glycine, dont l'étude a été faite en même temps et avec le même outillage.

D'ailleurs, outre l'identité de composition centésimale, on constate l'identité cristallographique, autant du moins que cela se peut sans recourir à des mesures. Le sable cristallin, précipité par addition d'alcool à la solution aqueuse concentrée de l'un ou l'autre chloroplatinate, offre au microscope des apparences tellement semblables, ainsi qu'on peut le voir sur les photographies, qu'il est impossible de reconnaître si une préparation a l'une ou l'autre origine.

Si, d'autre part, on redissout dans l'eau ce sable cristallin de précipi-

tation alcoolique, et qu'on abandonne à l'évaporation spontanée, on obtient, avec l'un ou l'autre chloroplatinate, les mêmes grands cristaux. Ceux-ci se présentent, tantôt sous l'aspect de prismes assez allongés, tantôt sous un aspect plus trapu d'allure octaédrique : mais les formes cristallographiques paraissent identiques, et l'aspect général des cristaux ne dépend que du développement relatif des faces de dômes ou de pyramides, développement réglé par l'acidité de la solution, l'excès de chlorure de platine, ou même par des circonstances fortuites. On peut trouver les deux apparences dans une même cristallisation, et ceci pour le chloroplatinate de glycyl-glycine authentique, aussi bien que pour le prétendu chloroplatinate de diacipipérazine.

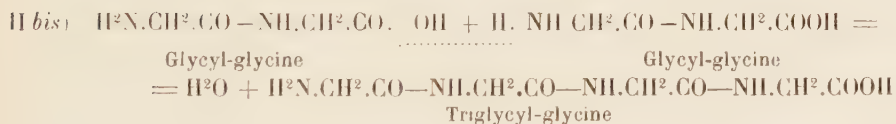
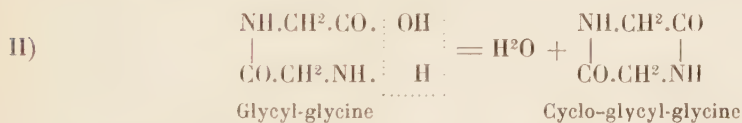
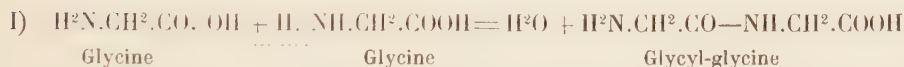
Nous concluons donc que le corps obtenu par l'action de l'acide chloroplatinique sur la 2.5. diacipipérazine n'est pas autre chose que le chloroplatinate de *glycyl-glycine* :



CHAPITRE III

PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE : RECHERCHE INFRUCTUEUSE DE LA GLYCYL-GLYCINE

Intérêt de la recherche de la glycyl-glycine. — Certaines raisons m'avaient conduit à me demander si la première phase de condensation du glycocolle au sein de la glycérine pourrait consister, ou non, en la formation de *glycyl-glycine*, susceptible à son tour de donner naissance, soit à la *cyclo-glycyl-glycine* (2.5. diacipipérazine), soit à la *triglycyl-glycine*, par les réactions éventuelles que voici :



Pour être en mesure de rechercher si une telle formation transitoire de glycyl-glycine aurait lieu en réalité, je me suis procuré d'abord, comme terme de comparaison, des échantillons authentiques de glycyl-glycine.

Préparations de la glycyl-glycine. — La glycyl-glycine a été préparée en partant de la *cyclo-glycyl-glycine* (2.5. diacipipérazine)

obtenue par ma méthode personnelle, et dont l'anneau a été ouvert par l'action de la soude à froid, suivant la méthode de E. FISCHER (1).

La cyclo-glycyl-glycine pure, finement pulvérisée (8 gr) est placée dans un flacon où l'on verse un peu plus que la quantité théorique de soude normale (80 cc.), et on agite avec soin. Au bout de 20 minutes seulement, les derniers grains d'anhydride ont disparu, et on attend encore 20 minutes ; puis on verse 80 cc. de HCl normal pour neutraliser exactement la soude. Mais E. FISCHER lui-même a fait remarquer déjà que si l'on concentre fortement pour obtenir une cristallisation de glycyl-glycine, on en laisse néanmoins une grande quantité dans les eaux-mères, où il est impossible de la séparer du chlorure de sodium.

J'ai tenté d'améliorer l'extraction en refroidissant la préparation, ce qui ne diminue guère, comme on le sait, la solubilité du chlorure de sodium, et pourrait abaisser avantageusement celle de la glycyl-glycine. La solution neutralisée est placée dans un large cristallisateur, et maintenue dans le vide sur H^2SO^4 ; après 3 jours le produit est complètement sec. Le cristallisateur est alors refroidi dans un mélange de glace et de sel marin ; on y verse 10 cc. d'eau glacée, et on broie le magma. On décante, traite à nouveau le magma refroidi par 10 cc. d'eau glacée, essore rapidement à la trompe : la majeure partie de NaCl est passée dans l'eau glacée. Le résidu est redissous dans le minimum d'eau bouillante (15 cc. environ) ; on ajoute 4 volumes d'alcool à 96°, ce qui donne instantanément un abondant précipité cristallin, et on maintient pendant 1 heure dans le mélange glace + sel marin. On essore à la trompe et lave rapidement avec un peu d'alcool réfrigéré.

J'ai ainsi obtenu 4 gr. 90 de beaux cristaux d'un blanc pur, nacrés, ne renfermant qu'une trace insignifiante de chlore, ce qui représente 53,4 0/0 seulement de la théorie.

En présence de ce rendement peu élevé, je me suis demandé s'il ne serait pas possible d'améliorer le procédé de E. FISCHER, en faisant passer le sodium sous une forme autre que le chlorure et plus facile à éliminer. J'ai employé pour la neutralisation, au lieu de HCl, l'*acide acétique*. 5 grammes de cyclo-glycyl-glycine pure pulvérisée sont introduits dans un flacon avec 50 cc. de soude normale, et agités jusqu'à dissolution complète, ce qui demande environ 20 minutes ; puis, après 20 autres minutes d'attente, on ajoute 50 cc. d'acide acétique

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden, IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 605, 1905).

normal, en constatant pour contrôle le virage au rose d'un fragment de papier de tournesol immergé dans la solution. Abandonné dans le vide sur H_2SO_4 pendant 2 jours, le liquide donne un sirop épais, puis une masse vitreuse, mais aucune cristallisation. On reprend alors par un peu d'eau bouillante, jusqu'à un volume de 20 cc. environ, on ajoute 3 volumes d'alcool à 96° qui produit un abondant précipité immédiat, et on essore aussitôt à la trompe, sans laisser refroidir. Les cristaux essorés sont redissous dans l'eau bouillante, jusqu'à un volume de 15 cc. ; on précipite une deuxième fois par 3 volumes d'alcool, et on essore aussitôt.

Les cristaux ainsi recueillis sont exempts d'acétate de sodium. En effet, le charbon brillant obtenu par calcination d'une parcelle de la substance, ne bleuit pas le papier de tournesol sensible, humide, sur lequel on l'écrase. Une petite quantité de cristaux, calcinée dans un creuset de platine avec 2-3 gouttes de H_2SO_4 , disparaît sans aucune tache résiduelle ; un peu d'eau bouillante versée dans le creuset n'y trouve pas trace de sulfate, ainsi que le démontre l'essai par BaCl_2 .

J'ai obtenu ainsi 4 gr. 27 de glycyl-glycine pure, en belles paillettes nacrées très blanches, soit 73,7 0/0 de la théorie. Le rendement est très supérieur à celui que donne la neutralisation par l'acide chlorhydrique (I).

Propriétés de la glycyl-glycine. D'après la description de E. FISCHER et E. FOURNEAU (2), la glycyl-glycine cristallise en petits feuillets à éclat nacré, qui, par chauffage rapide dans un tube capillaire, brunissent et se décomposent sans fondre vers 215° - 220° . Elle se dissout très facilement dans l'eau chaude, moins dans l'eau froide, mais néanmoins beaucoup plus abondamment que le glycinanhydride ; elle est très difficilement soluble dans l'alcool, pas du tout dans l'éther. La glycyl-glycine dissout l'oxyde cuivrique en suspension aqueuse, instantanément lorsqu'on chauffe, et donne un liquide bleu foncé dont l'évaporation laisse une masse cristalline bleu foncé formée de petits prismes, facilement soluble même dans l'eau froide.

1. Je me suis aperçu plus tard que E. FISCHER a déjà recommandé, dans un mémoire ultérieur (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 1906, voir p. 559), le remplacement de l'acide chlorhydrique par l'acide acétique ou l'acide iodhydrique lors de la neutralisation. Mes observations ne doivent donc être considérées que comme une simple confirmation des données de E. FISCHER lui-même.

2. E. FISCHER u. E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

J'ai retrouvé exactement ces propriétés sur mes échantillons de glycyl-glycine. En outre, on verra plus loin que j'ai tenté, dans un but de recherche microscopique, d'observer de plus près les apparences de la glycyl-glycine libre, de sa combinaison cuivrique et de ses combinaisons avec les acides picrique, chloroplatinique, silicoduodécitungs-tique.

Analyse centésimale. — Etant donné qu'il ne pouvait y avoir de doute sur la nature de la substance, l'analyse centésimale de contrôle n'a porté que sur l'azote. Elle fournit des chiffres qui concordent très bien avec la formule $C^3H^8N^2O^3$:

I. — Glycyl-glycine extraite après neutralisation chlorhydrique. — Substance : 0 gr. 1255. — Méthode Dumas : N^2 dégagé : 22 cc. 8 à 45^0 et 759,3 mm. (16^0) = 26 mgr. 4897. — $N = 21,11$ 0/0.

II. — Glycyl-glycine extraite après neutralisation acétique. — Substance : 0 gr. 1157. — Méthode Dumas : N^2 dégagé = 21 cc. 3 à 46^0 et 754,6 mm. (17^0) = 24 mgr. 4748. — $N = 21,15$ 0/0.

THÉORIE		ANALYSE	
pour $C^3H^8N^2O^3$		I	II
$C^3 = 48$	36,36	—	—
$H^8 = 8$	6,06	—	—
$N^2 = 28$	21,21	21,11	21,15
$O^3 = 48$	—	—	—
132	100,00		

Transformation spontanée de la glycyl-glycine en triglycyl-glycine. — Les échantillons de glycyl-glycine qui viennent d'être décrits ont été considérés comme purs : l'aspect homogène de leurs cristaux examinés au microscope, et les résultats de l'analyse centésimale, ne permettent pas d'admettre qu'ils puissent être souillés par une proportion appréciable de substances étrangères.

Cependant l'étude de la solution aqueuse de ces deux échantillons, isolés soit après neutralisation chlorhydrique, soit après neutralisation acétique, m'a appris qu'ils renfermaient une très petite quantité d'une substance biurétique. Or j'avais à peu près la certitude que la cyclo-

glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) employée pour ces préparations ne renfermait aucune trace de corps biurétique : il fallait en conclure que la substance qui donne ici la réaction du biuret avait pris naissance au cours des manipulations.

Pour être définitivement fixé, j'ai fait l'expérience suivante. D'une même préparation de cyclo-glycyl-glycine parfaitement pure, sont prélevés trois échantillons de 0 gr. 500 chacun, finement pulvérisés. Le premier échantillon, témoin, est simplement dissous dans 30 cc. d'eau (ce qui représente à peu près la saturation); les deux autres sont additionnés chacun de 5 cc. de soude normale, agités jusqu'à dissolution complète (15-20 minutes), abandonnés encore jusqu'à un temps total de 40 minutes, puis neutralisés respectivement par 5 cc. d'acide chlorhydrique normal et 5 cc. d'acide acétique normal (contrôle au papier de tournesol). Chacun de ces essais est alors porté à un volume total de 30 cc.

De chacun des 3 es-ais on prélève 10 cc. qui sont introduits dans un tube à essai avec 2 cc. de lessive de soude; on mélange bien, puis on verse goutte à goutte, à l'aide d'une fine pipette (42,4 gouttes par centimètre cube), une solution de sulfate de cuivre (35 gr. de CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$ par litre). Dans les 3 essais, la première goutte produit une légère teinte bleu céleste; avec 3 gouttes la teinte est bien apparente, bleu céleste sans mélange de violacé. Il en résulte que :

1° La cyclo-glycyl-glycine initiale est parfaitement exempte de substance biurétique.

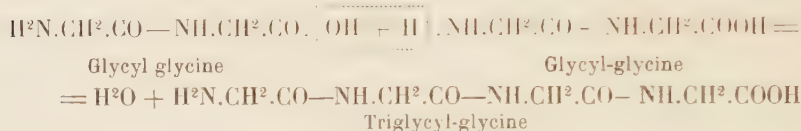
2° Le séjour de 40 minutes au contact de la soude n'a pas suffi pour faire apparaître dans les préparations de glycyl-glycine une quantité reconnaissable de substance biurétique.

Ceci posé, de chacun des 3 essais sont prélevés 10 cc. qui sont placés dans un petit cristalliseur, et les trois cristalliseurs disposés côte à côte sous une cloche à vide sur H_2SO_4 : deux jours après, on trouve les trois échantillons desséchés, celui qui contient l'acétate de sodium sous forme d'un enduit vitreux, les deux autres sous forme de cristaux. Chacun des trois résidus est redissous dans 10 cc. d'eau, additionné de 2 cc. de lessive de soude, puis de 3 gouttes de la solution de CuSO_4 . L'essai témoin contenant la cyclo-glycyl-glycine prend la légère teinte bleu céleste identique à celle des contrôles précédents ; les essais contenant la glycyl-glycine prennent tous deux une *teinte rose très nette*, et la présence du rose à côté du bleu est encore bien reconnaissable après addition de 20 gouttes de sulfate de cuivre à chacun des échantillons.

Aucun doute ne peut subsister : pendant le séjour de 48 heures dans

l'exsiccateur, la *glycyl-glycine* a donné naissance à une petite quantité d'une substance *biurétique*. Le phénomène s'est produit de la même manière dans les deux préparations, qu'elles aient subi la neutralisation chlorhydrique ou acétique.

La très faible quantité de la substance *biurétique* ainsi formée n'a pas permis, bien entendu, son isolement et son étude, mais de tout l'ensemble du présent travail il résulte que l'on doit songer aussitôt à la *triglycyl-glycine*, qui se formerait par union de 2 molécules de *glycyl-glycine* grâce à un phénomène de déshydratation :



La tendance de la *glycyl-glycine* à la condensation spontanée, en solution aqueuse, m'a paru intéressante à signaler. Elle n'avait pas encore été remarquée, à ma connaissance du moins. E. FISCHER et E. FOURNEAU (1), dans leur description de la *glycyl-glycine*, ne mentionnent pas cette propriété: on peut néanmoins se demander si la *glycyl-glycine* qu'ils ont eue entre les mains n'aurait pas renfermé des traces de *triglycyl-glycine*. Les chiffres d'analyse qu'ils donnent (2), tant pour le carbone que pour l'azote, sont légèrement *supérieurs* à la théorie (C = 36,550/0 au lieu de 36,36; N = 21,45 0 0 au lieu de 21,21), alors qu'il arrive en général le contraire; en revanche, l'hydrogène est presque théorique (6,08 0/0 seulement au lieu de 6,06), alors que d'ordinaire l'écart est plus considérable. On peut se demander si cette triple particularité est purement fortuite, ou s'il ne faudrait pas l'interpréter comme traduisant la présence, au sein de leur préparation, d'une très petite quantité d'un terme plus élevé dans la série de condensation des chaînes polyglycylques.

Quoi qu'il en soit, E. FISCHER et E. FOURNEAU n'ont pas signalé la tendance que possède la *glycyl-glycine* à se condenser spontanément en *triglycyl-glycine*. En revanche, ils ont observé un phénomène du même genre sur l'*éther* éthylique de la *glycyl-glycine* (3): chauffé rapidement vers 100°, ou même abandonné à 25° pendant dix jours, le *glycyl-glycinate* d'éthyle se transforme en un mélange de *glycinanhydride*

1. E. FISCHER et E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

2. *Ber. d. d. chem. Ges.*, t. 34, p. 2871.

3. *Ber. d. d. chem. Ges.*, t. 34, p. 2873-2874.

avec une petite quantité d'un corps biurétique que les auteurs reconnaissent comme vraisemblablement identique à la biurethbase de CURTIUS et GÖBEL (triglycyl-glycinate d'éthyle).

De mes recherches, il résulte que l'éthérisation n'est pas nécessaire, et que la *glycyl-glycine libre* se condense, elle aussi, spontanément en triglycyl-glycine.

Afin de voir si cette condensation peut prendre une certaine importance quantitative lorsque la glycyl-glycine séjourne un certain temps en solution aqueuse, surtout à chaud, un échantillon de glycyl-glycine cristallisée après neutralisation acétique, échantillon pesant environ 3 gr. 5, est placé dans un vase de Bohême avec 100 cc. d'eau, et porté au bain-marie bouillant, jusqu'à siccité. On remet alors 100 cc. d'eau, laisse évaporer jusqu'à siccité, remet 100 cc. d'eau, et ainsi de suite. L'essai a séjourné sur le bain-marie bouillant pendant 5 jours consécutifs, à raison de 8 heures par jour, soit 40 heures, donnant lieu à l'évaporation de 1900 cc. d'eau. Finalement le résidu séché d'abord au bain-marie, puis à 110°, est soigneusement détaché du vase avec une spatule, finement broyé et mélangé.

Le produit donne une réaction du biuret assez intense. Le dosage de l'azote a été fait, dans le but de voir si la proportion de triglycyl-glycine formée était notable et suffisante pour déterminer une élévation appréciable de la teneur centésimale en azote :

Substance : 0 gr. 1062. — Méthode Dumas : N² dégagé : 19 cc. 15 à 17° et 754,9 mm. (18°) = 21 mgr. 9069. — N = 20,63 0/0.

On voit que, loin d'augmenter, la teneur centésimale en azote a diminué, car l'échantillon de glycyl-glycine donnait primitivement 21,15 0/0. Mais il faut bien se garder de voir dans ce fait quoi que ce soit de contradictoire avec la formation de triglycyl-glycine, car il est très plausible de penser que le séjour dans l'eau chaude a pu hydrolyser un peu de glycyl-glycine, avec formation de glycocolle et baisse du chiffre centésimal d'azote.

Recherche microscopique de la glycyl-glycine. — Lorsqu'on possède un échantillon de *glycyl-glycine pure*, il suffit de laisser évaporer, sur une lame de microscope, une gouttelette de solution étendue, pour distinguer aussitôt la glycyl-glycine des prismes épais du glycocolle, ou des larges feuillets minces de la cyclo-glycyl-glycine. La glycyl-glycine ne montre pas, dans ces conditions, de cristaux bien formés, à arêtes vives, mais seulement des folioles lancéolées, à contours courbes et dentelés, qui se groupent en croix de manière à dessi-

ner les axes d'un système orthorhombique. D'autres fois, les cristallites élémentaires se groupent en une série de champs radiés se limitant respectivement par des contours polygonaux, et rappelant l'aspect d'écaillés de poisson. Ces cristallisations, très minces et d'une biréfringence peu considérable, s'éclairent simplement en blanc grisâtre entre nicols croisés, sans prendre les colorations nettes que présentent même les feuillets très minces de la cyclo-glycyl-glycine.

Malheureusement, dans les préparations qui contiennent un mélange de glycocolle, de cyclo-glycyl-glycine, de glycyl-glycine et de triglycyl-glycine, l'aspect des cristallisations perd beaucoup de son caractère, et je n'ai pu y reconnaître avec certitude la glycyl-glycine par observation directe.

J'ai donc cherché à utiliser des combinaisons de la glycyl-glycine. L'une d'elles paraîtrait à première vue très appropriée au but, c'est la *combinaison cuivrique*, parce qu'elle se forme très facilement, parce qu'elle empêche toute confusion avec la cyclo-glycyl-glycine qui ne donne pas de combinaison cuivrique, enfin parce que le chauffage avec la suspension d'oxyde cuivrique ne modifie pas les autres substances qui peuvent être présentes, la cyclo-glycyl-glycine en particulier. Malheureusement le glycyl-glycinate cuivrique est extrêmement soluble dans l'eau, même après addition d'alcool, et les solutions qu'on évapore peuvent rester très longtemps à l'état de sirop épais ou de vernis compact, avant de fournir le moindre cristal. En présence de matières étrangères, la cristallisation est pratiquement impossible. D'autre part, si les baguettes prismatiques de la combinaison cuivrique, lorsqu'on réussit à les obtenir, sont plus épaisses que les très fines aiguilles *habituelles* du glycinat cuivrique, celui-ci peut néanmoins se présenter quelquefois sous formes de baguettes prismatiques analogues, qui seraient une cause d'erreur. La recherche microchimique de la glycyl-glycine ne peut se faire à l'état de combinaison cuivrique.

On peut tenter de s'adresser aux combinaisons de la glycyl-glycine avec certains acides. J'ai notamment essayé l'acide picrique, dont la solution évaporée avec une solution de glycyl-glycine fournit de belles aiguilles soyeuses, très différentes des larges tables plates, à couleurs de polarisation extrêmement vives, du picrate de glycocolle. Malheureusement les aiguilles du *picrate de glycyl-glycine* ne montrent aucun élément cristallographique reconnaissable, et lorsqu'il s'agit d'appliquer la réaction à des produits mélangés, en présence de glycérine surtout, il est impossible de compter sur une certitude.

Il existe à vrai dire un *chloroplatinate de glycyl-glycine* parfaitement défini $(\text{HCl}.\text{NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOH})^2 \text{PtCl}_4, 2\text{H}_2\text{O}$, qui sera décrit

tout à l'heure, et dont les formes cristallines pourraient être caractéristiques. Mais on a vu dans le chapitre consacré à la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) que le traitement de ce corps par l'acide chloroplatinique fournit précisément le chloroplatinate de glycyl-glycine, à cause de l'ouverture de l'anneau pipérazique par l'acidité même du réactif chloroplatinique. Cette transformation hydrolytique n'est pas, il est vrai, instantanée ; mais comme nous ignorons pour l'instant sa vitesse et ses conditions, nous ne pouvons songer à rechercher la glycyl-glycine *en présence de cyclo-glycyl-glycine*, par le moyen d'un tel réactif.

Il en faut dire autant du *silicoduodécitungstate de glycyl-glycine* : ses cristaux pourraient peut-être être caractéristiques ; mais on sait qu'on obtient habituellement les silicotungstates à l'aide d'une solution d'acide silicoduodécitungstique *acidifiée par HCl*, et comme dans le cas de la glycyl-glycine la solubilité du sel oblige à laisser dessécher la préparation, il est à craindre que pendant ce temps l'ouverture hydrolytique de la cyclo-glycyl-glycine présente introduise une cause d'erreur.

Expérience faite, j'ai dû renoncer pour cette raison à rechercher la glycyl-glycine par les réactifs *acides* dans toutes les circonstances où la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) peut être présente, ce qui est le cas général dans mes travaux actuels.

Le caractère *alcalin* des réactifs est tout aussi prohibitif. Il semblerait tout naturel de faire agir, sur les mélanges où l'on recherche la glycyl-glycine, des substituants tels que le chlorure de benzoyle, le chlorure de β . sulfonaphtalène, etc..., car on sait avec quelle facilité se forment alors la *benzoyl glycyl-glycine*, la *naphtalène- β . sulfo-glycyl-glycine*, etc..., et certains de ces dérivés pourraient avoir un aspect caractéristique. Mais les réactions de ce genre se passent en milieu alcalin, et la 2.5.diacipipérazine est tellement sensible à l'alcalinité du milieu, comme l'a montré E. FISCHER (1), qu'on peut toujours craindre de lui voir fournir les dérivés de la glycyl-glycine sans que ce dernier corps pré-existe dans le mélange.

Force m'est donc de conclure que je ne connais à l'heure actuelle aucun procédé permettant de reconnaître avec certitude la glycyl-glycine en présence du glycocolle, de la cyclo-glycyl-glycine, etc., même en s'aidant de l'observation microscopique.

1. E. FISCHER Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 605, 1905).

Des tentatives auxquelles je me suis livré dans cette direction, ne subsistent comme résultats nouveaux que la description du chloroplatinate de glycyl-glycine et l'établissement de son identité avec le produit d'action de l'acide chloroplatinique sur la 2.5 diacipipérazine.

Chloroplatinate de glycyl-glycine. — L'étude de ce sel m'a paru nécessaire, étant données les questions qu'avaient soulevées la recherche analytique de la glycyl-glycine et l'action du chlorure de platine sur le glycinanhydride.

Préparation. — Dans un vase cylindrique de 125 cc. sont placés 2 gr. 5 de glycyl-glycine pure, préparée par la technique de E. FISCHER et contrôlée par l'analyse. On ajoute 7-8 cc. d'eau chaude, et on maintient un instant sur le bain-marie : la glycyl-glycine se dissout très facilement, et on peut laisser la solution reprendre la température ordinaire, sans cristallisation. D'autre part, 10 gr. de chlorure de platine sont dissous dans 60 cc. environ d'alcool absolu, et on ajoute 2-3 cc. d'acide chlorhydrique ordinaire; quand la solution alcoolique, qui s'est échauffée, est refroidie, on la verse dans la solution de glycyl-glycine, et on agite.

Au bout de quelques instants apparaissent de fins cristaux jaune-orangé, dont le nombre s'accroît pendant quelques minutes, et qui tombent au fond du vase. On décante, on essore à la trompe le sédiment cristallin, et on le lave deux fois rapidement par suspension dans l'alcool absolu et essorage à la trompe. Le chloroplatinate est séché dans le vide sur l'acide sulfurique, à la température ordinaire. L'échantillon obtenu pesait 5 gr. 89, soit un rendement de 87,6 0/0 de la théorie (pour la formule qui sera démontrée tout à l'heure).

Recherche de l'eau de cristallisation. — On part d'un échantillon de chloroplatinate de glycyl-glycine pesant environ 6 gr., et qui n'a plus perdu que 0 gr. 0013 entre la 24^e et la 70^e heure de séjour dans le vide sur H^2SO^4 , c'est-à-dire parvenu à constance de poids dans ces conditions.

De ce chloroplatinate séché dans le vide sont prélevés 0 gr. 8071, finement pulvérisés, qui sont portés à l'étuve à 110° (oscillant entre 109° et 111°), et qui subissent les pertes suivantes :

Durée du séjour à 110°	Perte totale	Perte relative
2 heures.	0,0391	4,84 0/0
3 heures.	0,0396	4,91
5 heures.	0,0402	4,98
7 heures.	0,0404	5,01

La température de l'étuve est alors élevée à 120° (oscillant entre 118°-120°) et l'essai subit de nouveau des pertes, qui sont calculées ci-dessous à partir du poids initial :

Durée du séjour à 120°	Perte totale	Perte relative
2 heures.	0,0423	5,24 0/0
4 heures.	0,0442	5,48

Jusqu'ici il est, non pas certain, mais possible, que la perte de poids soit due exclusivement à un départ d'eau, car le corps ne paraît pas avoir subi d'altération définitive : de nuance un peu briquetée à l'instant même où on le retire, tout chaud, de l'étuve, il revient en quelques instants à la teinte jaune un peu orangée du chloroplatinate primitif.

Mais au delà de 4 heures de séjour à 120°, il devient manifeste que le corps commence à se décomposer, car il prend à la surface une légère coloration brune permanente, qui s'accroît progressivement jusqu'à devenir d'un brun foncé, en même temps que le corps subit de nouvelles pertes de poids :

Durée du séjour à 120°	Perte totale	Perte relative
6 heures.	0,0461	5,71 0/0
8 heures.	0,0490	6,07
10 heures.	0,0514	6,37
12 heures.	0,0539	6,68
14 heures.	0,0573	7,12
16 heures.	0,0621	7,69
18 heures.	0,0657	8,14
20 heures.	0,0710	8,80
26 heures.	0,0928	11,50
32 heures.	0,1190	14,74
38 heures.	0,1408	17,44

On voit que la teneur en eau de cristallisation, si elle est réelle,

doit être comprise entre 5,01 0/0 et 5,48 0/0, ce dernier chiffre étant un maximum.

Une autre détermination de l'eau perdue à 110° a été faite sur un échantillon de chloroplatinate de glycyl-glycine qui, pulvérisé finement, et après dessiccation à froid dans le vide sur H²SO⁴, pesait 0 gr. 5058. Maintenu à l'étuve à 110°, cet échantillon a subi les pertes suivantes :

Durée du séjour à 110°	Perte totale	Perte relative
6 heures.	0,0252	4,98 0/0
11 heures.	0,0260	5,14
17 heures.	0,0287	5,66

Mais lors de la dernière pesée, l'échantillon manifestait déjà de légers signes d'altération, quoique n'ayant pas dépassé la température 110°. Le chiffre 5,66 0/0 est donc déjà un peu trop fort.

Les deux déterminations de la perte d'eau sont concordantes, le dernier chiffre trouvé avant le début des altérations définitives étant respectivement 5,48 0/0 et 5,14 0/0.

Mais il convient de se demander si la perte ainsi déterminée, même si elle est de l'eau, répond bien à de l'eau *de cristallisation*. Le chloroplatinate de glycyl-glycine, calculé avec 1 molécule H²O de cristallisation, c'est-à-dire de formule [(HCl.NH².CH².CO — NH.CH².COOH)² PtCl⁴ + H²O], contiendrait 2,60 0/0 d'eau de cristallisation : il ne saurait en être question. En revanche, un chloroplatinate à 2 molécules H²O, c'est-à-dire de formule : [(HCl.NH².CH².CO — NH.CH².COOH)² PtCl⁴ + 2H²O], contiendrait 5,07 0/0 d'eau de cristallisation, et peut répondre aux déterminations analytiques.

Cependant on peut se demander si l'eau qui s'échappe est bien de l'eau de cristallisation, ou si le corps ne pourrait perdre dès 110° de l'eau *de constitution*, par anhydrisation interne des molécules de glycyl-glycine engagées dans le chloroplatinate et se transformant peut-être en 2.5.diacipipérazine. Le chloroplatinate anhydre [(HCl.NH².CH².CO — NH.CH².COOH)², PtCl⁴], en cédant ainsi 2H²O, subirait une perte de poids de 5,34 0/0, très concordante avec les chiffres analytiques.

Le dosage des autres éléments pourra peut-être indiquer s'il s'agit d'une perte d'eau extra- ou intra-moléculaire. Voici les compositions centésimales comparatives :

Calculé pour (HCl.NH ² .CH ² .CO—NH.CH ² .COOH) ² , PtCl ⁴			Calculé pour (HCl.NH ² .CH ² .CO—NH.CH ² .COOH) ² , PtCl ⁴ + 2H ² O		
C ⁸	96	44,24	C ⁸	96	43,52
H ¹⁸	18	2,67	H ¹⁸	18	—
Cl ⁶	213	31,60	Cl ⁶	213	30,00
N ⁴	56	8,31	N ⁴	56	7,89
O ⁶	96	14,25	O ⁶	96	—
Pt	495	28,93	Pt	495	27,46
			2H ² O	36	5,07
	674	100,00		710	100,00

Dosage du platine. — I. — L'échantillon qui, séché dans le vide sur H²SO⁴, pèse 0 gr. 8071, et qui a subi le chauffage progressif à l'étuve à 110° puis à 120°, devenu brun, est redissous dans un peu d'eau, transporté dans une capsule de platine, séché, calciné doucement, pesé. Le résidu de platine pèse 0 gr. 2215. Teneur en platine : Pt = 27,44 0/0.

II. — Un autre échantillon de chloroplatinate, séché dans le vide sur H²SO⁴, et pesant 0 gr. 2610, a été calciné en présence de nitre et de Na²CO³ ; la masse fondue étant redissoute dans l'eau chaude, le platine libéré a été recueilli sur filtre, lavé, séché, calciné, pesé. Platine trouvé : 0 gr. 0720. Teneur en platine : Pt = 27,59 0/0.

III. — Un troisième échantillon de chloroplatinate de glycyl-glycine, séché dans le vide sur H²SO⁴, et pesant 0 gr. 2575, est calciné avec un excès du mélange de nitre et de carbonate de sodium (à poids égaux). La masse fondue est redissoute dans l'eau chaude, le platine libéré est recueilli sur filtre, lavé, séché, calciné, pesé. Platine trouvé : 0 gr. 0708. Teneur en platine : Pt = 27,49 0/0.

Dosage du chlore. — I. — L'échantillon de chloroplatinate pesant 0 gr. 2575, étant calciné avec un excès de nitre et de Na²CO³, la solution du produit et les lavages, filtrés, sont concentrés au bain-marie, et transportés dans une fiole jaugée de 150 cc., sans que le volume total avec les lavages dépasse 60 cc. On ajoute 5 cc. d'acide nitrique, puis 50 cc. de AgNO³ titré décimal, et on porte au bain-marie bouillant jusqu'à départ complet des vapeurs nitreuses. Après refroidissement, on complète à 150 cc., on filtre, prélève 100 cc. du filtrat, ajoute 4 cc. d'alun de fer en solution à 20 0/0, et verse jusqu'à virage une solution de sulfocyanate de potassium dont 14 cc. 85 équivalent à 15 cc.

de nitrate d'argent décimormal. Sulfocyanate versé : 47 cc. 95. Argent décimormal fixé par le chlore : 22 cc. 8. Chlore trouvé : 0 gr. 0809. Teneur en chlore : Cl = 31,42 0/0

II. — Echantillon de 0 gr. 2602. Même technique. Titre du sulfocyanate : 44 cc. 75 valent 15 cc. d'argent décimormal. Sulfocyanate versé : 47 cc. 75. Argent décimormal fixé par le chlore : 22 cc. 9. Chlore trouvé : 0 gr. 0813. Teneur en chlore : Cl = 31,25 0 0.

Dosage de l'azote. — I. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 2637. — N² dégagé : 47 cc. 65 à 46° et 774,7 mm. (20°) = 20 mgr. 7376. — N = 7,86 0/0.

II. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 2638. — N² dégagé : 47 cc. 9 à 48°5 et 766,1 mm. (21°) = 20 mgr. 7022. — N = 7,85 0/0.

Composition centésimale. — On voit que les chiffres trouvés pour la teneur en platine sont très concordants entre eux : Pt = 27,44—27,59 — 27,49, et très concordants aussi avec le chiffre 27,46 calculé pour le chloroplatinate à 2 molécules d'eau de cristallisation.

Il en est de mêmes des chiffres trouvés pour l'azote : N = 7,86—7,85, qui concordent parfaitement entre eux et avec le chiffre théorique 7,89 calculé pour le chloroplatinate à 2 molécules d'eau.

Seul le chlore donne des chiffres un peu forts : Cl = 31,42 — 31,25, qui surpassent le chiffre théorique 30,00 calculé pour le chloroplatinate à 2 molécules d'eau, et se rapprochent de la teneur 31,60 du chloroplatinate anhydre. Il ne me paraît pas cependant qu'il y ait là une objection sérieuse, car les petits cristaux analysés ont pris naissance dans un milieu riche en HCl et n'ont pu supporter, à cause de leur facile solubilité, que deux très rapides lavages à l'alcool, avec filtration à la trompe. L'imperfection de ce lavage n'est pas douteuse, et il semble assez naturel de lui attribuer le léger excès de chlore trouvé.

La formule du chloroplatinate de glycyl-glycine serait donc bien $[(HCl.NH^2.CH^2.CO — NH.CH^2.COOH)^2, PtCl^4, 2H^2O]$.

Présence certaine de l'eau de cristallisation. — Pour établir définitivement, avec certitude, l'intervention de l'eau dans la cristallisation, le contrôle suivant a été institué.

On a vu qu'un échantillon de chloroplatinate cristallisé, pulvérisé finement, et séché à froid dans le vide sur H²SO⁴, pesait 0 gr. 5058. Après un séjour de 17 heures dans l'étuve à 110°, il ne pesait plus que 0 gr. 4771, soit une perte de 0 gr. 0287 ou 5,66 0/0, et commençait à

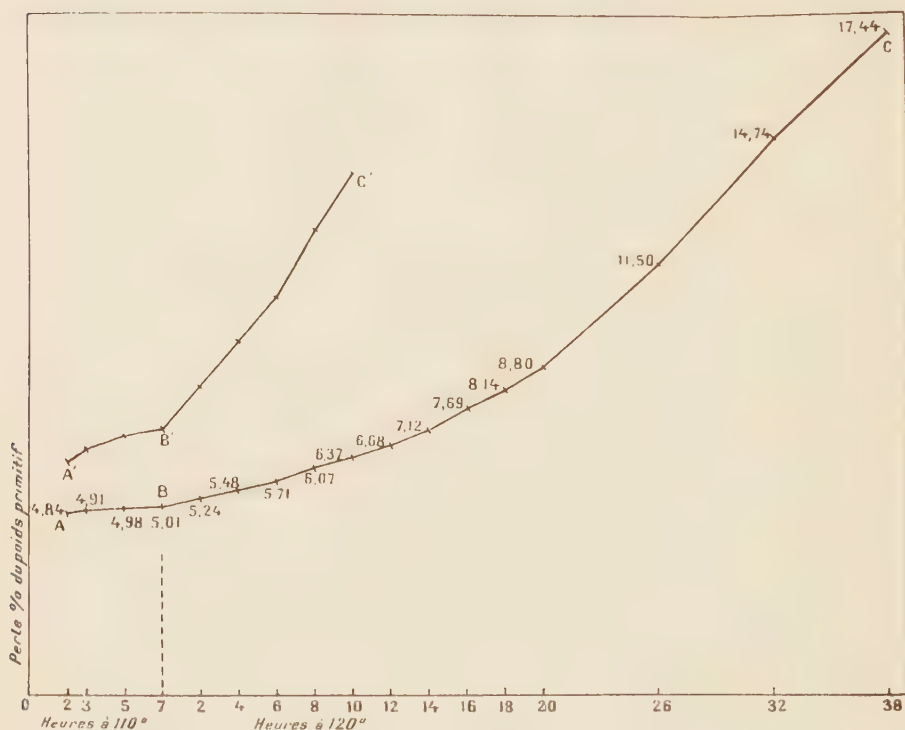
subir des altérations définitives. Néanmoins, repris par un peu d'eau chaude dans le vase même où il se trouvait, l'échantillon s'est redissous intégralement, et la solution évaporée rapidement sur H^2SO^4 , a laissé un résidu formé de cristaux semblables aux cristaux primitifs, quoique plus volumineux, ayant 1/2 à 1 mm. de diamètre.

Après 54 heures de séjour dans le vide sur H^2SO^4 , ces cristaux réhydratés pesaient 0 gr. 5044 : ils avaient donc repris depuis leur sortie de l'étuve à 110° un poids de 0 gr. 0273 (la perte à 110° du même échantillon ayant été 0 gr. 0287). Cependant la dessiccation de ces cristaux dans le vide sur H^2SO^4 ne se poursuivait que lentement, à cause de leur volume : ils furent donc finement pulvérisés et une partie aliquote (0 gr. 4996) fut de nouveau abandonnée dans le vide sur H^2SO^4 , où elle perdit encore 0 gr. 0042 après 72 heures, une dernière pesée après 96 heures donnant exactement le même chiffre. On calcule que l'échantillon complet pèserait dans ces conditions 0 gr. 5001 : il aurait donc repris au moins 0 gr. 0230 d'eau de cristallisation, soit 4,55 0/0 par rapport à la prise d'essai initiale, alors que la théorie pour les cristaux à $2\text{H}^2\text{O}$ donne 5,07 0/0. Si l'on se souvient qu'une petite portion du corps avait déjà subi à 110° une altération définitive, on jugera la concordance satisfaisante.

Il ne saurait subsister de doute sur la constitution du chloroplatinate, qui a bien pour formule $[(\text{HCl}.\text{NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOH})^2\text{PtCl}^4, 2\text{H}^2\text{O}]$. *Les deux molécules d'eau de cristallisation s'échappent dès 110°.*

Si l'on voulait d'ailleurs se convaincre qu'il existe une différence essentielle de nature entre la perte que subissent les cristaux du chloroplatinate à 110°, et celle qu'ils éprouvent lorsqu'on les maintient à 120°, il suffirait de considérer l'allure même des chiffres qui ont été déterminés plus haut pour l'échantillon maintenu d'abord à 110° pendant 7 heures, puis à 120° pendant 38 nouvelles heures. J'ai traduit ces chiffres par une courbe A B C dans laquelle les abscisses sont proportionnelles au temps, et où les ordonnées sont proportionnelles à la perte centésimale. Pour mettre mieux en évidence l'allure de la courbe dans sa région la plus intéressante, j'ai reproduit cette région dans une autre courbe A' B' C', dans laquelle les ordonnées sont amplifiées 5 fois, et dont l'axe des abscisses serait rejeté au dessous de celui de la courbe A B C. Cette échelle est suffisante pour faire éclater au premier coup d'œil que la courbe A B C se compose en réalité de deux branches bien distinctes. La première A B (ou A' B'), concave vers l'axe des abscisses, tend à devenir asymptotique à une parallèle à cet axe : elle traduit évidemment un phénomène limité, qui s'amortit avec le temps : c'est le départ à 110° de l'eau de cristallisation. La seconde B C (ou B' C'),

convexe vers l'axe des abscisses, représente un phénomène qui, loin de s'amortir, ne fait au contraire que progresser et même s'accélérer avec le temps : c'est un phénomène de *décomposition moléculaire*, qui se passe vers 120° .



Chloroplatinate de glycyl-glycine. — Perte de poids à 110° puis à 120° .

Cette étude suffira, j'espère, pour établir définitivement la constitution du chloroplatinate en question, qui s'obtient, on l'a vu déjà, soit directement à partir de la glycyl-glycine, soit indirectement à partir de la cyclo-glycyl-glycine.

Recherche de la glycyl-glycine dans les premières phases de la condensation du glyocolle. — Cette recherche a été faite sur 6 préparations différentes, toutes arrêtées à divers instants de la période où la proportion du glyocolle resté libre au sein de la glycérine a déjà commencé à baisser, sans toutefois s'être encore annulée complètement.

On trouvera plus loin dans un chapitre spécial le compte rendu d'une expérience exécutée simultanément sur 25 préparations, dans le but de déterminer quantitativement, de demi-heure en demi-heure, la marche des réactions de condensation. Parmi ces 25 préparations, j'ai choisi pour la recherche de la glycyl-glycine les quatre numéros 8, 10, 12, 14, ayant séjourné à la température 175° pendant 2 heures 1/2, 3 heures 1/2, 4 heures 1/2, 5 heures 1/2, respectivement. Si l'on se reporte aux chiffres du chapitre en question et aux courbes qui les traduisent, on verra que ces quatre échantillons étaient choisis parmi ceux où l'on doit s'attendre à rencontrer la glycyl-glycine, au cas où elle apparaîtrait en quantité appréciable. Deux autres préparations du même genre ont été également soumises à cette recherche, qui a été tentée, sur chacune des 6 préparations, de la manière suivante.

On verra que chacun des 25 mélanges glycérinés avait été porté à 100 cc. de solution aqueuse, dont une grande partie avait été consommée par une série de dosages. Du liquide restant, une petite portion a servi à une série directe de recherches par voie microscopique ; le reste a été concentré au bain-marie, puis délayé dans l'alcool absolu, de manière à fournir d'une part des cristaux, d'autre part un lavage alcoolique glycériné, soit deux fractions dont chacune, ramenée en solution aqueuse, a servi à une série de recherches : au total trois séries.

Pour chaque série, des gouttes évaporées sur lame ont permis de reconnaître très nettement des cristaux de cyclo-glycyl-glycine ainsi que de glycocolle restant ; mais dans les diverses formations cristallines du champ, aucune n'était assez caractéristique pour être rapportée avec certitude à la glycyl-glycine (pas plus d'ailleurs qu'à la triglycyl-glycine dont la présence était cependant certaine).

Des gouttes évaporées sur lame après addition d'une goutte d'acide picrique en solution à 1 0/0, ont montré nettement les feuillettes de la cyclo-glycyl-glycine, et les grandes tables plates, à couleurs de polarisation particulièrement vives, du picrate de glycocolle, mais rien qu'on pût attribuer avec certitude au picrate de glycyl-glycine.

Des gouttes évaporées sur lame après addition d'une goutte de chlorure de platine en solution additionnée de HCl, ou d'acide silicoduo-décitungstique en solution additionnée de HCl, ont bien permis de reconnaître, dans la plupart des préparations, des cristaux semblables à ceux du chloroplatinate ou du silicoduo-décitungstate de glycyl-glycine, mais il m'est impossible d'affirmer que cette glycyl-glycine était préexistante et n'a pas pris naissance secondairement sous l'action même du réactif.

Enfin, tout ce qui restait de chacun des échantillons examinés a été bouilli avec une suspension aqueuse d'oxyde cuivrique ; la solution s'est toujours colorée en bleu. En évaporant des gouttes sur lame, on a ici l'avantage de différencier aussitôt la cyclo-glycyl-glycine, qui ne fixe pas le cuivre et apparaît au microscope sous la forme de ses feuillets incolores habituels. Toutes les formations cristallines colorées en bleu ne peuvent dériver que du glycocolle, de la glycyl-glycine et peut-être de la triglycyl-glycine. J'ai bien observé dans plusieurs préparations, à côté des très fines aiguilles bleues qui sont certainement du glycinate de cuivre, quelques bâtonnets prismatiques plus volumineux qu'on pourrait peut-être interpréter comme glycyl-glycinate de cuivre, mais sans qu'aucun caractère décisif me permette d'affirmer qu'il ne s'agirait pas simplement de glycinate.

Comme dernière ressource, j'ai tenté d'utiliser la grande solubilité du glycyl-glycinate de cuivre. Les liquides bleus dont il vient d'être question étant concentrés jusqu'à cristallisation abondante d'aiguilles de glycinate de cuivre, les quelques gouttes d'eau-mère bleue ont été séparées. Si elles contenaient du glycyl-glycinate cuivrique en quantité appréciable, on devait s'attendre à leur trouver une coloration bleue plus intense qu'à une solution saturée de glycinate de cuivre (préparée à l'aide d'un glycocolle glycérimé dans les mêmes proportions). Or il ne m'a paru qu'il en fût ainsi : mes liquides bleus paraissent bien de teinte un peu plus sombre, mais cela provenait, semble-t-il, de leur nuance un peu verdâtre due à la présence d'un peu de matière brune. Rien n'autorise à les considérer comme plus riches en cuivre.

En résumé, aucune des tentatives faites pour caractériser la glycyl-glycine parmi les premiers produits de condensation du glycocolle au sein de la glycérine, n'a permis de conclure, avec quelque garantie, à un résultat positif.

Ceci ne prouve pas que la glycyl-glycine soit totalement absente ; mais je crois pouvoir conclure que *si la glycyl-glycine se forme au début de la condensation du glycocolle, ce ne peut être qu'en proportion tout à fait minime*. On conçoit d'ailleurs que la glycyl-glycine éventuelle ne tarderait pas à disparaître, au fur et à mesure de sa formation, par condensation plus avancée.

CHAPITRE IV

PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE : TRIGLYCYL-GLYCINE

Isolement de la triglycyl-glycine par fractionnement sans actions chimiques. — La triglycyl-glycine a été trouvée dans les produits de chauffage du glyocolle à 170° au sein de la glycérine, lorsque cette opération est arrêtée au bout d'un certain nombre d'heures, avant d'être arrivée au stade ultime des transformations. On trouvera plus loin des documents précis sur ce point, dans un chapitre spécial consacré à étudier dans le temps la *Marche de la réaction peptidogène*.

Le magma refroidi est, comme on l'a vu à propos de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine), délayé dans un assez grand volume d'alcool absolu (1) ; après repos, le liquide alcoolique et glyciné qui surnage est séparé, et le précipité est repris par l'eau bouillante. Dans le cas où les processus d'anhydrisation ont été poussés à fond, la solution aqueuse ne contient que la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) avec la matière colorante brun-noir ; et il reste comme résidu insoluble dans l'eau bouillante, la cyclo-polyglycyl-glycine que nous retrouverons plus loin. Mais dans le cas où on a interrompu le chauffage à temps, le résidu insoluble de cyclo-polyglycyl-glycine est nul ou peu abondant, moins abondant toujours que dans le cas précédent ; et en revanche la solution aqueuse contient, outre la matière colorante et la cyclo-glycyl-glycine, une autre substance encore. Si on décolore en effet cette solution par digestion avec du noir animal, puis qu'on la concentre au bain-marie jusqu'à cristallisation commençante de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine), on voit apparaître par refroi-

1. L'emploi de l'alcool *absolu* dans ces fractionnements a pour but de restreindre autant que possible les pertes par solubilité ; mais on peut très bien employer l'alcool ordinaire si les considérations économiques le conseillent.

dissement, non seulement les paillettes cristallines de la cyclo-glycyl-glycine, mais aussi des tourbillons chatoyants d'une fine poussière nacrée, d'aspect caractéristique, qui au microscope se montrent constitués de petits sphérules très réguliers. Toutes les solutions capables de fournir par concentration ces fins sphérules chatoyants, donnent une magnifique réaction du biuret, de teinte rose-carmin ; les autres solutions sont toujours exemptes de corps biurétique.

Les solubilités des deux substances dans l'eau ne sont pas assez différentes pour que la séparation soit pratique par voie de cristallisation aqueuse ; l'intervention de l'alcool est plus utile. Si on dissout le mélange des deux substances dans le minimum d'eau chaude, puis qu'on ajoute 3-4 volumes d'alcool fort, on obtient instantanément une précipitation contenant la majeure partie de la substance biurétique, très peu soluble dans l'alcool à 70°-80° qui constitue finalement le mélange, tandis que ce véhicule retient une quantité, assez minime il est vrai, mais non négligeable, de cyclo-glycyl-glycine dissoute. Le précipité, séparé de l'eau-mère alcoolique, est de nouveau redissous dans le minimum d'eau bouillante, et additionné de 3-4 volumes d'alcool fort, ce qui reprécipite encore la majeure partie de la substance biurétique et élimine une nouvelle quantité de cyclo-glycyl-glycine. En répétant l'opération un nombre de fois suffisant, on pouvait espérer parvenir à éliminer dans les eaux-mères alcooliques les dernières traces de la cyclo-glycyl-glycine, tandis que la substance biurétique resterait précipitée à l'état pur, et sans trop de pertes.

Malheureusement je n'ai pas tardé à m'apercevoir que le précipité produit par l'alcool, bien qu'à chaque précipitation sa quantité diminuât, exigeait pour sa redissolution un volume d'eau bouillante de plus en plus considérable. Au bout de quelques opérations, le volume d'eau nécessaire devenait énorme et on ne pouvait plus y dissoudre entièrement le résidu, sinon en ajoutant de l'ammoniaque. Il se produit donc ici des altérations secondaires, qui m'ont empêché pendant longtemps d'obtenir pour le produit des chiffres d'analyse constants et ont entravé beaucoup mes recherches pour déterminer la constitution des corps et reconnaître leur mode de formation.

Enfin j'ai pu établir que dans ces conditions la substance biurétique primitive, soluble dans l'eau très facilement à chaud (triglycyl-glycine), disparaît peu à peu pour faire place à une deuxième substance également biurétique, mais extrêmement peu soluble dans l'eau, même bouillante. A cette deuxième substance, soluble dans l'eau par addition d'ammoniaque, et reprécipitable par les acides, j'ai pu assigner, comme on le verra plus loin, une constitution de pentaglycyl-glycine.

La pentaglycyl-glycine paraît se former chaque fois qu'un mélange de triglycyl-glycine et de cyclo-glycyl-glycine subit un séjour un peu prolongé dans l'eau chaude ; il résulte de là une première indication pour réussir l'isolement de la triglycyl-glycine : *éviter les manipulations prolongées en milieu aqueux, surtout à chaud, tant que la cyclo-glycyl-glycine n'est pas entièrement éliminée.*

Il faut d'autre part, pour l'obtention de la triglycyl-glycine, s'adresser à un produit de chauffage glycérique aussi riche que possible en substance biurétique. On verra plus loin, dans le chapitre consacré à la *Marche de la réaction peptidogène*, que cette condition dépend de deux facteurs : le moment où l'on arrête le chauffage, et la proportion de glycérine que l'on avait introduite dans le mélange, par rapport au glycocolle.

Pour suivre la marche de la réaction peptidogène, on prélève de temps en temps, avec une baguette, quelques gouttes du mélange chaud de glycocolle et de glycérine, on les dissout dans quelques centimètres cubes d'eau, et on fait bouillir avec un peu d'oxyde cuivrique précipité et lavé, en suspension aqueuse. Au début, on obtient une coloration bleue intense, due à la dissolution de l'oxyde cuivrique par le glycocolle encore intact ; la coloration bleue diminue d'intensité dans les essais suivants, à mesure que le glycocolle disparaît par condensation. Mais il faut bien se garder de poursuivre le chauffage jusqu'à ce qu'on n'obtienne plus aucune coloration bleue, car la triglycyl-glycine d'abord produite, se serait alors transformée à son tour en cyclo-polyglycyl-glycine. La triglycyl-glycine elle-même, en effet, dissout un peu d'oxyde de cuivre ; lorsqu'on juge que la légère coloration bleue du liquide lui est due et non plus au glycocolle, il suffit de filtrer le liquide bleu et de lui ajouter une goutte de soude : la coloration vire aussitôt au rose-carmin (réaction du biuret).

D'autre part, on peut suivre le développement de la substance biurétique dans le mélange, en prélevant de temps en temps quelques gouttes de ce mélange, qu'on dissout dans quelques centimètres cubes d'eau : on ajoute de la soude, puis une goutte de sulfate de cuivre en solution étendue. Dans les premières heures, on n'obtient qu'une teinte bleu pur ; ensuite elle devient violette, puis rose-carmin. A ce moment, plus l'essai est riche en triglycyl-glycine, plus il supporte de gouttes de solution cuivrique, tout en restant de teinte carminée et avant de virer au violacé. On peut donc, en comptant les gouttes de solution cuivrique nécessaires pour atteindre ce virage, *déterminer approximativement l'époque du maximum* de richesse en triglycyl-glycine. Pour mieux voir les

teintes, on peut au préalable décolorer l'essai par un peu de noir animal.

Enfin, on verra plus loin, dans un chapitre spécial, la très remarquable *Influence de la proportion de glycérine* sur la valeur des fractions du glyocolle qui passent respectivement à l'état de cyclo-glycyl-glycine et de triglycyl-glycine. Pour obtenir le meilleur rendement en cette substance, il faut *restreindre autant que possible la proportion de la glycérine par rapport au glyocolle*. On est cependant limité par la nécessité d'employer la glycérine en quantité suffisante pour dissoudre le glyocolle et maintenir une fluidité convenable au mélange : en pratique la quantité de la glycérine sera comprise entre 2 et 3 fois celle du glyocolle.

Une fois acquises par l'expérience, ces données m'ont permis de régler une technique appropriée à l'isolement de la triglycyl-glycine par de simples fractionnements basés sur les différences de solubilité dans des milieux sans action chimique, c'est-à-dire d'obtenir la substance sans altération secondaire, et dans l'état même où elle existe au sein du mélange chauffé.

Préparation de la triglycyl-glycine. — Dans un petit vase cylindrique en tôle émaillée, on place 100 gr. de glyocolle pur, qu'on chauffe au bain-marie en ajoutant avec ménagement de l'eau bouillante jusqu'à dissolution totale. On verse alors 250 gr. de bonne glycérine commerciale à 30° B., on mélange, et on place le vase dans une étuve à air déjà chauffée vers 100°-120°. On élève la température progressivement pour ne pas risquer un dégagement tumultueux de vapeur d'eau, puis on maintient la température à 170°-175°. Tant que le mélange ne brunit pas, il est inutile de faire des essais. Lorsqu'il commence à brunir, on suit sur des prises d'essai le développement de la substance biurétique : le maximum est atteint lorsque le mélange chaud offre une certaine teinte rouge acajou qui peut servir de guide lorsqu'on a l'habitude de la réaction. On laisse alors refroidir.

Le mélange refroidi est introduit dans un flacon de 5 litres, au moyen du délayage par l'alcool, qu'on emploie à la dose totale de 3-4 litres. On agite bien, puis on laisse reposer, dans un lieu froid si possible; on a intérêt à prolonger le repos plusieurs jours, ce qui augmente la masse des flocons de triglycyl-glycine précipitée.

On décante la majeure partie de l'alcool glycériné, on introduit le sédiment dans des tubes de centrifugeuse qu'il ne quittera plus, et on centrifuge pour éliminer autant que possible l'alcool glycériné. Le culot de centrifugation est bien remis en suspension dans de l'alcool à 80°, dont on remplit les tubes : ceux-ci, disposés dans un panier

métallique, sont plongés dans une marmite d'eau chauffée sur un réchaud où on les laisse digérer pendant 20-30 minutes, en ayant soin d'atteindre, vers la fin, l'ébullition de l'alcool à 80°. Pendant ce temps on remet plusieurs fois en suspension le dépôt, à l'aide d'une baguette. L'alcool à 80° bouillant dissout une assez forte quantité de cyclo-glycyl-glycine, mais aussi une quantité de triglycyl-glycine qui n'est pas négligeable et qu'il ne faut pas perdre. Si on laisse refroidir le liquide, la majeure partie de cette triglycyl-glycine se dépose en flocons, qui rejoignent le résidu insoluble, mais en même temps cristallise une assez forte quantité de cyclo-glycyl-glycine qui viendra à nouveau souiller le dépôt.

Pour accélérer la séparation, il est bon d'employer le tour de main suivant. Quand la matière a suffisamment digéré dans l'alcool à 80° bouillant, on a soin de ne pas laisser refroidir, mais on centrifuge aussitôt et on décante le liquide alcoolique tout chaud. On est sûr ainsi d'enlever d'un seul coup une grande quantité de cyclo-glycyl-glycine. Pour récupérer la triglycyl-glycine dissoute en quantité appréciable dans l'alcool à 80° chaud, on refroidit le mieux possible la solution alcoolique décantée : le lendemain on trouve la triglycyl-glycine précipitée en légers flocons en suspension dans le liquide, tandis que les cristaux de la cyclo-glycyl-glycine tapissent les parois du vase ; on peut, sans les détacher, verser le liquide trouble contenant les flocons de triglycyl-glycine, et se servir de ce liquide pour un nouvel épuisement du culot de centrifugation.

On fait ainsi une série de digestions dans l'alcool à 80° bouillant et de centrifugations : bientôt la totalité de la cyclo-glycyl-glycine a passé dans les lavages. Pour s'assurer que le résidu en est bien exempt, on prélève une parcelle qu'on dissout dans un peu d'eau chaude et dont on évapore des gouttes sur lames. Il est très facile, au microscope, de reconnaître s'il existe ou non, à côté de la triglycyl-glycine, les feuillets caractéristiques de la cyclo-glycyl-glycine.

Les lavages par l'alcool à 80° doivent être poursuivis jusqu'à élimination *complète* de la cyclo-glycyl-glycine. On peut alors reprendre le résidu par l'eau chaude, qui dissout aisément la triglycyl-glycine et laisse indissoute la cyclo-polyglycyl glycine qui l'accompagne généralement en quantité plus ou moins grande ; une dernière centrifugation sépare les deux corps. La solution aqueuse de triglycyl-glycine est décolorée par digestion au bain-marie avec un peu de noir animal, puis concentrée jusqu'à cristallisation, et donne par refroidissement la substance pure.

Constitution de la substance biurétique. — Dans les pages qui précèdent, la substance biurétique soluble a été désignée d'avance, pour la facilité du langage, sous le nom de triglycyl-glycine ; reste à justifier cette détermination.

1° La substance, donnant la réaction du biuret, doit être constituée par plusieurs fragments moléculaires dans l'union desquels *intervient le chaînon double* ($-\text{CO}-\text{NH}-$).

2° La substance, ne fournissant d'autre produit d'hydrolyse que du glycocolle, doit être *constituée exclusivement par des groupements glycyliques* unis entre eux par voie de déshydratation.

En effet, un échantillon pesant environ 2 gr., placé dans un petit ballon, a été bouilli pendant environ 6 heures avec de l'acide chlorhydrique concentré ; la réaction du biuret avait alors disparu. Evaporé à sec, le produit, séparé autant que possible des parois par grattage avec un gros fil de platine, a été additionné de 50 cc. d'alcool absolu et saturé de HCl gazeux, puis on a évaporé dans le vide, à siccité. L'éthérification et l'évaporation à sec ont été répétées encore deux fois. Au microscope, le résidu se montrait formé d'un magma d'aiguilles dans lequel il était impossible de distinguer d'autres formations. Repris par l'alcool, le produit a été cristallisé en 4 fractions successives qui, jusqu'à la dernière, montraient les mêmes aiguilles, sans autre formation. Enfin les 4 fractions de cristallisation alcoolique, reprises par l'eau et réunies, ont été divisées encore, par cristallisation dans l'eau, en 4 fractions où le microscope n'a pu révéler aucune substance d'aspect différent. Le produit était donc constitué tout entier par une substance unique, où il était facile de reconnaître le chlorhydrate de glycinate d'éthyle $\text{HCl}.\text{NH}^2.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5$. Ne fournissant pas autre chose que du glycocolle par décomposition hydrolytique, la substance biurétique est donc constituée exclusivement par des groupements glycyliques.

3° La substance biurétique est formée de groupements glycyliques *unis en chaîne ouverte*. Nous en trouvons la preuve dans sa faculté de dissoudre l'oxyde de cuivre, ce qui paraît exiger pour la chaîne des extrémités libres, sans qu'il soit besoin de savoir si Cu se fixe sur le carboxyle ou sur l'aminogène. On sait en effet que la cyclo-glycyl-glycine est incapable de fixer le cuivre, qui se fixe au contraire, soit sur le glycocolle, soit sur la glycyl-glycine à extrémités libres

4° Reste à établir le *rang, supérieur à 2* (la glycyl-glycine n'étant pas biurétique), de la chaîne ouverte de glycyles qui constitue la substance. J'ai eu recours dans ce but à l'analyse centésimale.

Analyse centésimale. — Le dosage du carbone et de l'hydrogène a été exécuté sur deux échantillons différents :

I. — Substance : 0 gr. 3017. — CO^2 : 0 gr. 4308. — H^2O : 0 gr. 1621. — C = 38,94 0/0. — H = 5,97 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 2529. — CO^2 : 0 gr. 3609. — H^2O : 0 gr. 1390. — C = 38,91 0/0. — H = 6,09 0/0.

Trois autres analyses, faites au début des recherches, avaient donné pour le carbone des chiffres un peu plus élevés, mais j'ai dû les éliminer pour avoir constaté que les échantillons contenaient une proportion importante de substance biurétique insoluble dans l'eau (c'est-à-dire de pentaglycyl-glycine). Au contraire les deux échantillons sur lesquels ont été faites les analyses ci-dessus étaient entièrement solubles dans l'eau.

Peut-on, d'après les déterminations du carbone et de l'hydrogène, situer la substance dans la série des chaînes ouvertes polyglycylques de longueur croissante ? Reportons-nous au tableau de la composition centésimale de ces chaînes :

		C	H	N
		—	—	—
Glycine.	M = 75	32,00	6,67	18,67
Glycyl-glycine . . .	M = 132	36,36	6,06	21,21
Diglycyl-glycine. . .	M = 189	38,10	5,82	22,22
Triglycyl-glycine . .	M = 246	39,02	5,69	22,76
Tétraglycyl-glycine. .	M = 303	39,60	5,61	23,10
Pentaglycyl-glycine. .	M = 360	40,00	5,56	23,33
Hexaglycyl glycine . .	M = 417	40,29	5,52	23,50
Heptaglycyl-glycine. .	M = 474	40,51	5,49	23,63

En ce qui concerne le carbone, les chiffres trouvés 38,94 et 38,91 sont notablement supérieurs à celui de la diglycyl-glycine et doivent appartenir à un corps plus condensé. Ils concordent parfaitement avec celui de la triglycyl-glycine, dont ils ne diffèrent que de —0,08 et —0,11.

La concordance est également très admissible pour les chiffres d'hydrogène, 5,97 et 6,09, qui ne surpassent le chiffre théorique 5,69 de la triglycyl-glycine que de 0,28 et 0,40. La seconde analyse faisait partie d'une série où, par suite de la disposition des appareils, l'excès d'hydrogène était toujours assez fort (0,35-0,45).

Le dosage de l'azote a été fait d'abord par la méthode Dumas, sur le même échantillon qui avait servi au second dosage de carbone.

III. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 4017. — N² dégagé : 18 cc. 4 à 16° et 746,7 mm (17°5) = 20 mgr. 8906. — N = 20,54 0/0.

IV. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 4009. — N² dégagé : 17 cc. 9 à 19° et 772,9 mm. (20°5) = 20 mgr. 7722. — N = 20,58 0/0.

Or, si l'on compare ces chiffres trouvés par la méthode Dumas, 20,54 et 20,58, avec le tableau des enchaînements glycyliques successifs, on trouve qu'ils ne concorderaient, et même avec un déficit plus grand qu'à l'ordinaire, qu'avec la glycylyl-glycine. Cependant la substance ne peut être la glycylyl-glycine, puisque celle-ci n'est pas biurétique, et doit occuper un rang plus élevé dans la série des condensations. Il était donc à penser que le chiffre d'azote fourni par les analyses était notablement inférieur à la réalité.

Pour élucider la question, j'ai eu recours à la méthode Kjehldahl, sur le même échantillon de substance :

V. — Méthode Kjehldahl. Substance : 0 gr. 4350. — NH³ quart-normal recueilli : 8 cc. 35, contenant 0 gr. 029925 de N. — N = 22,47 0/0.

Un autre échantillon de substance, exempt de pentaglycylyl-glycine, a donné les chiffres suivants :

VI. — Méthode Kjehldahl. Substance : 0 gr. 4433 — NH³ quart-normal recueilli : 9 cc. 15, contenant 0 gr. 032025 de N. — N = 22,35 0/0.

Il est à remarquer que dans les dosages par la méthode Kjehldahl on a toujours eu soin de faire, par essai à blanc sur les réactifs, une légère correction pour les petites quantités d'ammoniaque apportées par ceux-ci. Les chiffres indiqués ici ne sauraient donc être, en aucun cas, erronés par excès, et doivent au contraire être légèrement inférieurs à la réalité. Dans le tableau des enchaînements polyglycyliques, nous devons donc chercher, non au-dessous, mais au-dessus des chiffres expérimentaux 22,47 et 22,35, ce qui nous amène encore à la triglycylyl-glycine (N = 22,76 0/0).

Les dosages du carbone, et les dosages de l'azote *par la méthode Kjehldahl* concordent donc très bien pour assigner au corps une formule de *triglycylyl-glycine* :

THÉORIE pour $C^8H^{14}N^4O^5$		ANALYSE			
		I	II	V	VI
$C^8 = 96$	39,02	38,94	38,91	—	—
$H^{14} = 14$	5,69	5,97	6,09	—	—
$N^4 = 56$	22,76	—	—	22,17	22,35
$O^5 = 80$	—	—	—	—	—
246	100,00				

Difficulté du dosage de l'azote par la méthode Dumas dans les chaînes polyglycyliques supérieures. — De la discussion des chiffres d'analyse, ressort, on vient de le voir, une particularité très intéressante en ce qui concerne le dosage de l'azote : la méthode Dumas fournit des chiffres trop faibles, et force est bien de constater qu'elle est difficilement applicable au cas de la triglycyl-glycine.

Ce n'est pas sans mûre réflexion que je me décide à formuler cette réserve vis-à-vis d'une méthode analytique aussi estimée, et à si juste titre, de tous les chimistes, à qui elle rend journellement d'incomparables services par sa précision et sa simplicité. J'aurais voulu croire d'abord à des fautes de technique, malgré le soin apporté au montage des tubes à combustion et notamment à la dispersion très fine de la substance à brûler dans une longue colonne d'oxyde de cuivre. Mais alors que les acides aminés eux-mêmes, et les cyclo-glycyl-glycines (2.5. diacipipérazines) dérivées du glycocolle, de la sarcosine, de l'alanine, de la valine de la leucine, me donnaient toujours d'excellents chiffres d'azote par la méthode Dumas, cette méthode m'a toujours donné des erreurs par défaut, non seulement avec la triglycyl-glycine, mais aussi, comme on le verra plus loin, avec la pentaglycyl-glycine et la cyclo-polyglycyl-glycine. Une telle coïncidence ne peut être fortuite.

D'autre part, la cyclo-polyglycyl-glycine qui sera étudiée plus loin est certainement identique à la substance déjà obtenue par L. BALBIANO et D. TRASCIATTI sous le nom d'anhydride « corné » du glycocolle. La cyclo-polyglycyl-glycine $(-NH.CH^2.CO-)^{42}$ contient authentiquement 24,56 0/0 d'azote ; or L. BALBIANO et D. TRASCIATTI (1) avaient obtenu d'abord par la méthode Dumas : 22,4 — 22,3 — 22,2, de sorte qu'ils avaient attribué au corps une formule fausse $C^{22}H^{34}N^{10}O^{13}$ (au lieu de

1. L. BALBIANO u. D. TRASCIATTI. Ueber ein neues Derivat des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 33. 2323, 1900).

$C^{12}H^{13}N^{11}O^{11}$ d'où ils déduisaient des conséquences erronées, notamment la formation probable d'acide glycolique à côté du glycolle lors de l'hydrolyse. Par la suite L. BALBIANO (1) s'aperçut qu'un même échantillon, qui ne lui donnait que 21,9 par la méthode Dumas, fournissait 24,09 par la méthode Kjehldahl, rectification qui lui permit de reconnaître la véritable nature du corps. « La détermination de l'azote faite par la méthode de Kjehldahl m'a démontré, dit-il, que dans ce cas, en brûlant la substance avec de l'oxyde de cuivre, on n'isole pas tout l'azote sous forme libre ».

Je n'ai donc fait que retrouver sur la triglycyl-glycine, la pentaglycyl-glycine, et la cyclo-polyglycyl-glycine, le défaut de la méthode Dumas qu'avait observé L. BALBIANO sur l'un de ces trois corps.

Enfin je rappelle que les deux autres corps de ma série, la triglycyl-glycine (2) et la pentaglycyl-glycine (3), ont été déjà obtenus par E. FISCHER, par une autre voie. L'analyse de la pentaglycyl-glycine a été faite par la méthode Dumas; mais celle de la triglycyl-glycine a eu lieu par la méthode Kjehldahl, ainsi d'ailleurs que celle d'un certain nombre de polypeptides et de dérivés préparés à cette époque par E. FISCHER. Cette coïncidence est-elle purement fortuite, ou le choix de la méthode Kjehldahl était-il intentionnel de la part de l'éminent chimiste? Je n'ai rencontré dans ses œuvres aucune indication à ce sujet.

Quoi qu'il en soit, je crois devoir mettre les chimistes en garde contre l'insuffisance de la méthode Dumas dans le cas des chaînes polyglycyl-iques, et même en rechercher une explication. En vidant les tubes où la combustion avait été insuffisante, j'ai remarqué que dans la région occupée par la substance, les brins d'oxyde de cuivre en fils n'avaient pas la belle couleur vive habituelle du cuivre réduit, mais se trouvaient comme vernissés par endroits d'un enduit noir-rougeâtre ou de couleur grenat. Lorsqu'on analyse une substance volatile ou capable de se transformer entièrement par pyrogénéation en produits volatils, chaque molécule va se brûler sur une surface d'oxyde de cuivre incandescent, et la combustion est parfaite (cyclo-glycyl-glycine, par exemple). Lorsqu'on traite une substance fixe ou donnant parmi ses produits de pyrogénéation une substance fixe au rouge, le dosage du carbone peut encore être

1. L. BALBIANO. Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, I, 410, 1902).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. II (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 2486, 1904).

3. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XIV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 453, 1906).

excellent parce qu'il se fait dans un courant d'oxygène qui va brûler chaque parcelle. Mais il n'en est plus de même pour l'azote ; si minutieux que soient les soins au montage, on ne saurait prétendre étaler le corps en couche *infinitement mince* à la surface de l'oxyde de cuivre ; l'action comburante de celui-ci ne se fait sentir peut-être qu'à une distance très limitée, et les parcelles les plus éloignées peuvent rester incomplètement brûlées, si leur fixité au rouge leur interdit le transport. Du moins n'ai-je constaté jusqu'ici les erreurs par défaut de la méthode Dumas, qu'avec des substances particulièrement *rebelles à la volatilisation*.

On trouvera dans la dernière partie de ce travail un autre exemple de substances dont l'azote est difficile à obtenir en totalité par la méthode Dumas : ce sont les matières humiques azotées qui prennent naissance par la condensation des sucres avec les acides aminés.

Propriétés de la triglycyl-glycine. — La triglycyl-glycine ne présente pas de propriétés bien saillantes, capables d'attirer l'attention et de la faire reconnaître facilement. Sur le bloc Maquenne, ou même dans un petit tube scellé au bain sulfurique, elle ne montre pas de point de fusion, mais brunit et charbonne progressivement entre 230° et 280°. Elle se dissout facilement dans l'eau chaude, d'où elle se précipite lentement par refroidissement, si elle est en excès, sous la forme de sphérules très fins et réguliers, dont la suspension dans le liquide produit des tourbillons chatoyants particuliers (c'est peut-être là le seul caractère frappant de la triglycyl-glycine, caractère que conservent les échantillons de cyclo-polyglycyl-glycine qui en dérivent par anhydrisation complète). La solution aqueuse refroidie contient encore une quantité notable de triglycyl-glycine, qui est assez facilement soluble dans l'eau froide. L'alcool produit instantanément dans la solution aqueuse un abondant précipité granuleux et amorphe ; cependant la triglycyl-glycine n'est pas tout à fait insoluble dans l'alcool, même fort.

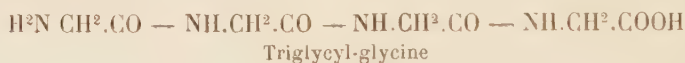
La triglycyl-glycine dissout à l'ébullition l'oxyde cuivrique précipité, et forme un liquide bleu clair dont la teinte rappelle celle du glycinate de cuivre en solution diluée. On n'obtient jamais des solutions bleues aussi fortement colorées qu'avec le glycocole : simple question de teneur en cuivre. Si à la solution filtrée du triglycyl glycinate de cuivre, bleu clair, on ajoute un excès de soude, on voit aussitôt la teinte bleu clair virer au rose carmin : si elle restait plus ou moins violacée, c'est que le liquide contiendrait encore du glycocole, un aminoacide ou un polypeptide abiurétique.

En présence d'un excès de soude et d'une petite quantité de sulfate

de cuivre, la triglycyl-glycine donne une magnifique réaction du biuret, coloration rose carmin qui peut être très intense si la solution est riche en tétrapeptide. Avec la soude et une goutte de chlorure de nickel, elle donne une belle coloration jaune d'or; avec la soude et une goutte de nitrate de cobalt, une coloration brun rougeâtre.

Il n'est pas facile d'obtenir la combinaison de la triglycyl-glycine avec les réactifs précipitants acides : par exemple si à une solution aqueuse concentrée de triglycyl-glycine on ajoute une solution alcoolique concentrée d'acide picrique, on précipite bien le tétrapeptide, mais à l'état libre et non à l'état de picrate, comme on le constate en essorant le précipité à la trompe.

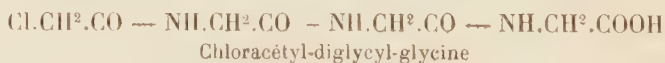
Comparaison de la triglycyl-glycine nouvellement préparée avec la triglycyl-glycine de E. Fischer — On a pu remarquer que jusqu'ici la caractérisation de la substance en tant que *triglycyl-glycine* :



a eu lieu *exclusivement* par ses caractères intrinsèques, et indépendamment de tout document comparatif puisé dans la littérature. Je tiens à insister sur la garantie que présente la ligne de conduite que je m'étais ainsi imposée; elle m'avait paru nécessaire dans un travail où il est parfois délicat de distinguer entre elles des substances de composition très voisine, et où toute idée préconçue pourrait être nuisible à la bonne identification de ces substances.

Mais ceci posé, et la constitution de la triglycyl-glycine obtenue dans mes recherches étant bien et dûment établie comme s'il s'agissait d'un corps entièrement nouveau, il était nécessaire de confronter ses caractères avec les documents que possède déjà la science.

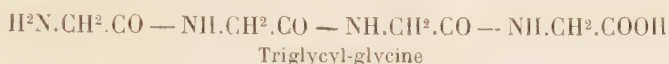
La triglycyl-glycine a été préparée déjà par E. FISCHER (1) en traitant la *diglycyl-glycine*, en solution sodique, par le *chlorure de chloracétyle* : l'acidification ultérieure du mélange détermine la cristallisation de la *chloracétyl-diglycyl-glycine* :



Le dérivé chloré est à son tour chauffé pendant 1 heure à 100°

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. II (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 2486, 1904).

avec 5 fois son poids d'ammoniaque aqueuse à 25 0/0, puis la solution est évaporée fortement, et additionnée de beaucoup d'alcool : tandis que le chlorure d'ammonium reste en solution, on obtient un précipité de *triglycyl-glycine* :



Pour la purification, le produit brut fut dissous dans 8 fois son poids d'eau, bouilli avec un peu de noir animal, et le filtrat précipité de nouveau par l'alcool : la quantité du produit ainsi obtenu, exempt de chlore et déjà bien pur, atteignait 60 0/0 de la théorie. Pour l'analyse, la substance fut encore deux fois précipitée de l'eau par l'alcool, puis séchée à 100°, « car à la température ordinaire elle retient même dans le vide une quantité variable d'eau (2-3 0/0) ».

Par la *méthode Kjeldahl*, E. FISCHER a trouvé pour l'azote un chiffre satisfaisant (22,42 0/0 au lieu de 22,76). Pour le carbone, son chiffre est un peu fort (39,26 0/0 au lieu de 39,02) : existerait-il dans son produit un peu de pentaglycyl-glycine ? Voici intégralement la description que donne E. FISCHER du tétrapeptide :

« La *triglycyl-glycine* n'a pas de point de fusion. Elle commence à partir de 220° à se colorer, et vers 270° elle est tout à fait foncée ; par chauffage plus fort elle dégage beaucoup d'ammoniaque. En solution alcaline elle donne avec les sels de cuivre une assez forte coloration biurétique, et de même la solution aqueuse dissout à chaud l'oxyde de cuivre avec une coloration bleu-violet. La solution aqueuse à une réaction très faiblement acide au tournesol, elle est quasi insipide. La substance est plus difficilement soluble dans l'eau que les polypeptides plus simples de la glycine ; elle exige environ 4 parties d'eau chaude. Bien qu'elle soit beaucoup plus difficilement soluble à froid, elle ne se sépare cependant que très lentement du liquide chaud. La précipitation a lieu aussitôt par addition d'alcool : ainsi obtenu, le tétrapeptide constitue une poudre incolore, qui a sans aucun doute une structure cristalline, mais dans laquelle on ne trouve même sous le microscope aucune forme particulièrement caractéristique. »

Le caractère sommaire de la description de E. FISCHER ne fait que traduire le caractère peu accusé et peu significatif des propriétés du corps ; cette description concorde avec ce que j'ai observé sur la *triglycyl-glycine* préparée par ma méthode, mais on voit qu'il eût été peu prudent de la prendre pour guide en vue de l'identification.

Transformation de la substance biurétique en chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle. — La triglycyl-glycine possède d'ailleurs des dérivés cristallins plus nettement caractérisés qu'elle-même : j'ai tenu à parfaire l'identification de ma substance en la faisant passer à l'état de chlorhydrate d'éther éthylique.

C'est L. LEVY qui a le premier obtenu, dans le laboratoire de TH. CURTIUS (1) le chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle, en partant de la « base biurétique » de TH. CURTIUS, qui allait être reconnue comme étant le triglycyl-glycinate d'éthyle lui-même, mais qui n'a même pas besoin d'être pure, car les échantillons employés renfermaient une certaine quantité de glycinanhydride (cyclo-glycyl-glycine). 6 gr. de Biurethbase sont broyés avec 400 cc. d'alcool absolu, et, tout en refroidissant dans la glace, on introduit du gaz HCl presque jusqu'à saturation. On fait alors bouillir un instant, et on filtre pour éliminer une plus ou moins grande quantité de glycinanhydride resté indissous. Par refroidissement se séparent environ 2,5 gr. de chlorhydrate, sous forme d'une masse floconneuse blanche, qui est essorée, lavée à l'alcool absolu, et séchée dans un exsiccateur sur la potasse. La solution mère, complètement évaporée dans le vide sur la potasse, laisse un résidu formé de chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle, à l'état pur. Les analyses sont bonnes.

La même préparation, renouvelée avec des échantillons de Biurethbase qui renfermaient, l'un 12 0/0 environ, l'autre jusqu'à 40 0/0 de glycinanhydride, a donné néanmoins avec facilité le chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle, car lorsqu'on fait bouillir la substance dans l'alcool chlorhydrique, le glycinanhydride reste indissous et s'élimine facilement par filtration.

Il est évident que l'ébullition dans l'alcool chlorhydrique n'a pas ici besoin d'être prolongée, puisqu'il ne s'agit pas de faire une éthérification, déjà réalisée dans la Biurethbase, mais seulement de préparer le chlorhydrate de cette base. Aussi suffit-il, pour obtenir ce même sel, de broyer la Biurethbase pure avec un peu d'alcool chlorhydrique, et d'abandonner dans le vide dans un exsiccateur à potasse (TH. CURTIUS (2)). Dans de telles conditions, l'hydrolyse de la triglycyl-glycine elle-même par HCl n'est pas à craindre.

D'après la description de TH. CURTIUS (2), le *chlorhydrate de triglycyl-*

1. TH. CURTIUS. Ueber die freiwillige Zersetzung des Glykocollsters (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1284, 1904).

2. TH. CURTIUS. Ueber die freiwillige Zersetzung des Glykocollsters (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1284, 1904).

glycinate d'éthyle cristallise de l'alcool chaud en petites tablettes anisotropes à cassure peu régulière, mais à limites souvent rectangulaires, qui fondent à 192-193° sans coloration, avec dégagement gazeux. Le sel est soluble en se jouant dans l'eau froide, insoluble dans les dissolvants neutres ; il est difficilement soluble dans l'alcool bouillant.

E. FISCHER (1) a ensuite préparé le chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle, en partant de la triglycyl-glycine elle-même. Il chauffe modérément 4 gr. du tétrapeptide avec 100 cc. de HCl en solution alcoolique saturée à chaud : le tétrapeptide entre en solution, et dès qu'on arrive à l'ébullition persistante, commence la cristallisation du chlorhydrate d'éther. Après refroidissement, on essore, lave à l'alcool et à l'éther (rendement 4 gr.). Pour la purification, on dissout 1 gr. du sel dans 200 cc. d'alcool absolu chaud, et on le sépare de nouveau par refroidissement, après addition d'un peu d'alcool chlorhydrique. Les analyses étaient satisfaisantes. Toutefois le chlorhydrate cristallisé en petits feuillets minces, fondait, en se colorant et dégageant un peu de gaz, à 208-210° (corr. 212°-214°), alors que TH. CURTIUS avait indiqué un point de fusion moins élevé (192°-193°). E. FISCHER lui-même fait observer qu'il ne faut pas accorder trop d'importance à cet écart, car chez les sels de ce genre le point de fusion est abaissé très fortement par une petite proportion d'impuretés.

J'ai à mon tour préparé le *chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle*, sans recourir à l'isolement préalable de la triglycyl-glycine elle-même, à cause du caractère très laborieux de cet isolement et des pertes qui l'accompagnent. M'inspirant du procédé suivi par L. LEVY dans le laboratoire de TH. CURTIUS, j'ai fait directement l'éthérisation du tétrapeptide malgré la présence d'une grande quantité de cyclo-glycyl-glycine et d'un peu de cyclo-polyglycyl-glycine.

Le chauffage de 100 gr. de glyocolle avec 300 gr. de glycérine, à 170°, est poursuivi jusqu'au moment où le glyocolle a entièrement disparu, mais où la formation de la cyclo-polyglycyl-glycine a seulement commencé, laissant subsister une notable quantité de triglycyl-glycine. Après délayage de la masse dans l'alcool absolu, et addition de ce réactif tant que le précipité augmente, la préparation est abandonnée pendant 4 jours à la glacière, puis le précipité est essoré à la trompe. Il est nécessaire de le débarrasser très soigneusement de toute glycérine interposée, car la présence de celle-ci à la fin des manipulations gênerait beaucoup la cristallisation du chlorhydrate cherché, et pourrait

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. II (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 2486, 1904).

faire échouer la préparation. Dans ce but, le précipité est à plusieurs reprises broyé très finement avec un peu d'alcool absolu, puis essoré : à la fin, on s'assure que le dernier alcool de lavage ne laisse plus, à l'évaporation, aucune trace de glycérine.

Le précipité est alors placé dans un ballon, mis en suspension dans 300-400 cc. d'alcool absolu préalablement saturé de HCl, et porté sur un bain-marie bouillant où on le maintient jusqu'à ce que l'alcool soit en pleine ébullition. On verse le contenu du ballon sur un entonnoir à essorer (qu'on a eu la précaution de chauffer au préalable à 80-100° pour éviter le refroidissement trop rapide du liquide), et on essore fortement. La cyclo-polyglycyl-glycine et la presque totalité de la cyclo-glycyl-glycine restent sur le filtre. Sans se préoccuper des cristaux qui prennent naissance par refroidissement dans le filtrat limpide (chlorhydrate d'éther, avec un peu de cyclo-glycyl-glycine), on place ce filtrat dans un large cristalliseur, dans le vide sous une cloche en présence d'acide sulfurique et de potasse en fragments, jusqu'à dessiccation complète. On reprend par le minimum d'alcool absolu bouillant, on filtre bouillant pour éliminer un peu de cyclo-glycyl-glycine restée indissoute, et on laisse cristalliser par refroidissement. On recristallise encore une fois ces cristaux dans l'alcool absolu pour éliminer un peu de chlorhydrate de glycinate d'éthyle, qui reste dans les eaux-mères.

On obtient finalement un corps très bien cristallisé en fines aiguilles blanches, qui fondent à 196°-196°5 corr., en petits tubes scellés, au bain sulfurique, par fusion rapide. La substance donne une magnifique réaction du biuret, en rose carmin très intense.

L'analyse a consisté dans le dosage du chlore et de l'azote.

Dosage du chlore. — I. — Substance : 0 gr. 2625. Sans destruction de la molécule organique, la substance est dissoute directement dans 100 cc. d'eau, on ajoute 5 cc. de HNO_3 , puis 20 cc. 0 de AgNO_3 décimal, 4 cc. d'alun de fer, puis du sulfocyanate équivalent à l'argent, jusqu'à virage rouge, soit 12 cc. 0. — Argent décimal consommé par Cl : 8 cc. 0. — Cl trouvé : 0 gr. 0284. — Teneur : Cl = 10,82 0/0.

II. -- Substance : 0 gr. 3096. Calciné avec 4 gr. d'un mélange à poids égaux ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{KNO}_3$) et 4,5 gr. de KNO_3 . Le produit est dissous dans 100 cc. d'eau, on ajoute 10 cc. de HNO_3 , puis 20 cc. 0 de AgNO_3 décimal, 4 cc. de solution d'alun de fer, puis du sulfocyanate décimal jusqu'à virage rouge, soit 9 cc. 45. — Argent décimal consommé par Cl : 10 cc. 55. — Cl trouvé : 0 gr. 0374. — Teneur : Cl = 12,08 0/0.

Dosage de l'azote. — III. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1298. — Azote dégagé : 21 cc. 2 à 24° et 759,2 mm. (22°) = 23 mgr. 9136. — N = 18,42 0/0.

Si l'on compare les chiffres donnés par l'analyse avec ceux qu'exige la théorie pour le *chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle* $\text{HCl.NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO-NH.CH}^2.\text{CO-NH.CH}^2.\text{COO}^2\text{CH}^3$, ou $\text{C}^{10}\text{H}^{19}\text{ClN}^4\text{O}^5$, on obtient le tableau suivant :

THÉORIE pour $\text{C}^{10}\text{H}^{19}\text{ClN}^4\text{O}^5$		ANALYSE		
		I	II	III
$\text{C}^{10} = 120$		—	—	—
$\text{H}^{19} = 49$		—	—	—
$\text{Cl} = 35,45$	11,42	10,82	12,08	—
$\text{N}^4 = 56$	18,04	—	—	18,42
$\text{O}^5 = 80$		—	—	—
	<u>310,45</u>			
	400,00			

Bien que les chiffres analytiques n'aient pas ici une grande précision, on voit qu'ils concordent suffisamment avec la formule. Aucune erreur n'est d'ailleurs possible sur le rang du polypeptide, ainsi qu'on peut le voir en calculant les teneurs théoriques en chlore et en azote pour les chlorhydrates des trois termes consécutifs : diglycyl-glycinate, triglycyl-glycinate, tétraglycyl-glycinate d'éthyle :

	Cl	N
Chlorhydr. de diglycyl-glycinate d'éthyle $\text{C}^8\text{H}^{16}\text{ClN}^3\text{O}^4$	13,99	16,37
Chlorhydr. de triglycyl-glycinate d'éthyle $\text{C}^{10}\text{H}^{19}\text{ClN}^4\text{O}^5$	11,42	18,04
Chlorhydr. de tétraglycyl-glycinate d'éthyle $\text{C}^{12}\text{H}^{22}\text{ClN}^5\text{O}^6$	9,65	19,05

C'est avec le dérivé du tétrapeptide que concordent le mieux les chiffres d'analyse. On le voit mieux encore si l'on considère le rapport R de l'azote au chlore dans les trois termes successifs :

Chlorhydr. de diglycyl-glycinate d'éthyle	$R = \frac{\text{N}^3}{\text{Cl}} = \frac{3 \times 14}{35,45} = 4,185$
Chlorhydr. de triglycyl-glycinate d'éthyle	$R = \frac{\text{N}^4}{\text{Cl}} = \frac{4 \times 14}{35,45} = 4,58$
Chlorhydr. de tétraglycyl-glycinate d'éthyle	$R = \frac{\text{N}^5}{\text{Cl}} = \frac{5 \times 14}{35,45} = 4,975$

En calculant ce rapport sur les chiffres trouvés, et en prenant successivement pour le chlore le chiffre supérieur, la moyenne, et le chiffre inférieur, on a :

$$\text{Pour Cl supérieur : } R = \frac{18,42}{12,08} = 1,525$$

$$\text{Pour Cl moyen : } R = \frac{18,42}{11,45} = 1,61$$

$$\text{Pour Cl inférieur : } R = \frac{18,42}{10,82} = 1,70$$

Le chiffre inférieur pour le chlore (10,82 0/0) est manifestement trop faible, à cause de la perturbation apportée dans le titrage par la molécule organique (on en aura la preuve tout à l'heure). Si on élimine le rapport correspondant, on voit que les deux autres (1,525 et 1.61) concordent avec le dérivé de la triglycyl-glycine (1.58) et avec lui seul.

Comparaison du chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle avec le chlorhydrate de la « base biurétique » de Th. Curtius. — Bien que le rang de mon polypeptide fût ici encore déterminé intrinsèquement par sa transformation en chlorhydrate d'éther éthylique, j'ai tenu à comparer ce sel avec celui de la « base biurétique » préparée suivant les données de TH. CURTIUS (1).

Je me suis donc procuré d'abord le glycinate d'éthyle en éthérifiant le glycocolle, en suspension dans l'alcool absolu, par un courant de HCl sec, ce qui donne le *chlorhydrate de glycinate d'éthyle* $\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOC}^2\text{H}^5$, puis dissolvant le chlorhydrate dans un peu d'eau glacée, ajoutant peu à peu de la soude réfrigérée et un grand excès de K^2CO^3 , puis extrayant à l'éther le glycinate d'éthyle. La solution éthérée est séchée par Na^2SO^4 anhydre, puis distillée au bain-marie pour chasser l'éther dissolvant, et il reste le *glycinate d'éthyle* $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOC}^2\text{H}^5$. On s'est efforcé autant que possible d'abriter ce corps contre toute rentrée de vapeur d'eau ; on l'additionne alors du tiers de son poids d'éther absolu rectifié sur le sodium, et on abandonne le mélange dans un flacon clos par un bon bouchon à l'émeri enduit de silicate de potassium.

Au bout d'un mois on recueille par essorage le magma cristallisé, on lave plusieurs fois à l'éther absolu, puis on chasse des lavages l'éther véhicule, et le résidu de glycinate d'éthyle est abandonné

1. TH. CURTIUS. Ueber die freiwillige Zersetzung des Glykocollesters (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1284, 1904).

comme précédemment après addition d'un tiers de son poids d'éther absolu.

Après un second mois on recueille une deuxième fraction de cristaux, dont les eaux-mères et les lavages contiennent encore du glycinate d'éthyle, qui est à nouveau remis en préparation. Après un troisième mois on recueille de nouveaux cristaux, qui sont bien lavés à l'éther, et la préparation se borne là.

Les trois fractions cristallines réunies sont mises en suspension dans l'alcool absolu préalablement saturé de HCl; on chauffe progressivement jusqu'à pleine ébullition, et on filtre bouillant pour éliminer une quantité appréciable de glycinahydride (cyclo-glycyl-glycine). Le filtrat, où des aiguilles cristallines prennent déjà naissance par refroidissement, est desséché sous cloche à vide en présence de H_2SO_4 et KOH, puis le résidu est recristallisé deux fois dans l'alcool absolu bouillant, et séché à froid sur H_2SO_4 . Fines aiguilles blanches fondant à $193^\circ\text{--}193\frac{1}{2}$ corr., en petits tubes scellés, au bain sulfurique, par fusion rapide. Magnifique réaction du biuret, en rose carmin très intense. Comme avec le produit de ma méthode personnelle, l'analyse a consisté dans le dosage du chlore et de l'azote.

Dosage du chlore. — I. — Substance : 0 gr. 3003. Sans destruction de la molécule organique, la substance est dissoute directement dans 100 cc. d'eau, on ajoute 5 cc. de HNO_3 , puis 20 cc. 0 de AgNO_3 décimormal, 4 cc. de solution d'alun de fer, puis du sulfocyanate décimormal jusqu'à virage rouge, soit 10 cc. 85. — Argent décimormal consommé par Cl : 9 cc. 15. — Cl trouvé : 0 gr. 0324. — Teneur : Cl = 10,79 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 3052. Calciné avec 4 gr. d'un mélange à poids égaux ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{KNO}_3$) et 1,5 gr. de KNO_3 . Le produit est dissous dans 100 cc. d'eau, on ajoute 10 cc. de HNO_3 , puis 20 cc. 0 de AgNO_3 décimormal, 4 cc. de solution d'alun de fer, puis du sulfocyanate décimormal jusqu'à virage, soit 10 cc. 45. — Argent décimormal consommé par Cl : 9 cc. 55. — Cl trouvé : 0 gr. 0339. — Teneur : Cl = 11,11 0/0.

Dosage de l'azote. — III. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1245. — Azote dégagé : 20 cc. 05 à 21° et 758,4 mm. (23°) = 22 mgr. 5883. — N = 18,14 0/0.

On voit que, ici encore, le dosage volumétrique du chlore directement sans calcination dans le chlorhydrate organique, donne un chiffre un peu faible. Si d'ailleurs on compare la teneur en chlore (10,79 0/0 et 11,11 0/0) du produit préparé par la méthode TH. CURTIUS avec celle

(10,82 0/0 et 12,08 0/0) du produit préparé par ma méthode personnelle, puis la teneur en azote (18,14 0/0) du produit de la méthode TH. CURTIUS avec celle (18,42 0/0) du produit de ma méthode, on sera convaincu de l'identité des deux corps.

Tous deux se ressemblent au point que rien ne permet de distinguer les deux échantillons. L'écart de 3° entre le point de fusion (196°-196°5) du produit de ma méthode et celui (193°-193°5) du produit de la méthode TH. CURTIUS, est insignifiant et résulte sans doute d'une trace plus ou moins appréciable d'impuretés (cyclo-glycyl-glycine, chlorhydrate de glycinate d'éthyle).

D'autres dérivés de la triglycyl-glycine ont été encore décrits par TH. CURTIUS (1) : *chloroplatinate de triglycylglycinate d'éthyle* $\text{HCl.NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5]^2 \text{PtCl}^4 + 2\text{H}^2\text{O}$, *picrate de triglycylglycinate d'éthyle* $\text{C}^6\text{H}^2(\text{NO}^2)^3\text{OH.NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5$, *triglycylglycinate de cuivre* $[\text{NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COO}]^2 \text{Cu} + \text{H}^2\text{O}$, *diazoacétyl-diglycyl-glycinate d'éthyle* $\text{N}^2.\text{CH}.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5$, *diazoacétyl-diglycyl-glycinamide* $\text{N}^2.\text{CH}.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO.NH}^2$, *diiodacétyl-diglycyl-glycinate d'éthyle* $\text{I}^2\text{CH}.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5$, *oxyacétyl-diglycyl-glycinate d'éthyle* $\text{HO}.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5$, *triglycyl-glycin-hydrazide* $\text{NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{NH}^2)$ et son *chlorhydrate* $\text{HCl.NH}^2.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{NH}^2).\text{HCl}$, *benzal-triglycyl-glycine-benzalhydrazine* $\text{C}^6\text{H}^5.\text{CH}=\text{N}.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^2-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO}-(\text{NH}.\text{N}=\text{CH}.\text{C}^6\text{H}^5)$, *benzoyl-triglycyl-glycinate d'éthyle* $\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^3-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5$, *benzoyl-tétraglycyl-glycinate d'éthyle* $\text{C}^6\text{H}^5.\text{CO}-(\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^4-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOC}^2\text{H}^5$.

Mais je n'ai pas cru devoir consacrer mon temps à la préparation de ces dérivés, la triglycyl-glycine obtenue par ma méthode personnelle me paraissant identifiée déjà d'une manière indiscutable.

1. TH. CURTIUS. Ueber die freiwillige Zersetzung des Glykocollesters (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1284, 1904).

CHAPITRE V

PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE : PENTAGLYCYL-GLYCINE.

Préparation de la pentaglycyl-glycine. — On a vu déjà, dans le chapitre consacré à étudier sommairement l'*Action de la glycérine sur le glycorolle*, les circonstances très intéressantes dans lesquelles apparaît la pentaglycyl-glycine. Lorsque la masse glycérinée qui a subi le chauffage à 170°-175° a été délayée dans l'alcool, et que le dépôt solide a été débarrassé de la glycérine par lavages alcooliques, on redissout aisément ce dépôt dans l'eau, chaude de préférence, et l'on sépare par filtration ou centrifugation la petite quantité de cyclo-polyglycyl-glycine qui peut être présente. Le liquide aqueux est fortement coloré par la matière brune, mais il est parfaitement limpide ; on le décolore presque entièrement par une courte digestion avec du noir animal, et on filtre à nouveau.

Au moment où il vient d'être filtré, le liquide, parfaitement limpide, renferme en solution la triglycyl-glycine et la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine). Mais on a vu que si les manipulations exigées pour la séparation de ces deux substances conduisent à les laisser séjourner longtemps dans l'eau chaude, la triglycyl-glycine, biurétique, aisément soluble, disparaît peu à peu pour faire place à une autre substance également biurétique, mais insoluble cette fois dans l'eau même bouillante, et cela tant qu'il y a de la cyclo glycyl-glycine en présence de la triglycyl-glycine.

Si on désire se procurer un échantillon de la substance biurétique insoluble, il y a donc intérêt à prolonger autant que possible le séjour dans l'eau chaude. On place la solution mixte de triglycyl-glycine et de cyclo-glycyl glycine dans une capsule au bain-marie, en renouvelant l'eau qui s'évapore : on ne tarde pas à voir apparaître des flocons blancs semblables à ceux d'une albumine en voie de coagulation. Lorsque ces

flocons ne paraissent plus augmenter, on centrifuge le tout et on décante le liquide surnageant. Mais les flocons se tassent mal et forment toujours un culot très volumineux, véritable éponge qui retient une grande quantité d'eau-mère : pour cette raison il est difficile et fastidieux de laver à fond les flocons par le seul procédé de la centrifugation. Cependant, lorsque celle-ci a séparé déjà une grande partie de l'eau-mère, on peut essorer à la trompe le magma floconneux : on arrive à éliminer le reste de l'eau-mère. Mais il faut savoir que les flocons ont une grande tendance à adhérer au papier, et qu'il faut leur éviter tout commencement de dessiccation à son contact : aussitôt que le liquide est passé, on prend le diaphragme de papier, et d'un jet de pissette on détache aussitôt la couche de matière floconneuse.

Celle-ci, remise en suspension dans une grande quantité d'eau, ne se dissout pas, même à l'ébullition ; l'addition d'ammoniaque la fait passer en solution. La neutralisation par un acide, l'acide acétique par exemple, précipite instantanément toute la substance en volumineux flocons blancs, opération qui rappelle à s'y méprendre la précipitation d'une solution alcaline de caséine. On se débarrasse comme précédemment de la nouvelle eau-mère, on renouvelle plusieurs fois la redissolution dans l'ammoniaque et la précipitation par l'acide acétique. (On peut aussi chauffer la solution au bain-marie : l'évaporation de l'ammoniaque laisse déposer la substance biurétique sous forme de pellicules).

On termine par une série de lavages, par suspension puis essorage, dans l'eau bouillante, dans l'alcool bouillant, dans l'éther. La masse versée dans un cristalliseur lorsqu'elle est encore humide d'éther ou d'alcool, se contracte très fortement par la dessiccation spontanée, et forme alors un petit fromage compact d'un blanc pur.

Il est bon d'être prévenu d'une complication qui se présente fréquemment si l'on conduit autrement l'isolement de la pentaglycyl-glycine, et qui m'a beaucoup gêné dans mes recherches jusqu'au jour où j'ai réussi à en établir la cause. En présence de liquides contenant en solution de la cyclo-glycyl-glycine et de la triglycyl-glycine, plus, en suspension, de la pentaglycyl-glycine et de la cyclo-polyglycyl-glycine, il m'arrivait de procéder de la manière suivante. Le mélange étant chauffé et additionné d'ammoniaque pour dissoudre la pentaglycyl-glycine, on filtrait pour éliminer la cyclo-polyglycyl-glycine insoluble, puis le filtrat opalescent était acidifié par l'acide acétique, pour précipiter la pentaglycyl-glycine tandis que la cyclo-glycyl-glycine et la triglycyl-glycine restaient en solution dans les eaux-mères. En redissolvant dans l'eau ammoniacale le produit de précipitation acétique,

reprécipitant par l'acide acétique, redissolvant dans l'eau ammoniacale, etc., on obtenait toujours un liquide *opalescent*, filtrant difficilement à travers les papiers, mais paraissant *homogène* à l'œil nu, et *ne flocculant pas* spontanément, même après une année de conservation (en présence d'un peu d'alcool).

J'aurais donc été tenté, pendant longtemps, d'attribuer l'opalescence à la pentaglycyl-glycine elle-même, ce qui ne concordait pas avec d'autres observations, jusqu'au jour où j'ai pu établir que l'opalescence était due à des parcelles excessivement ténues de cyclo-polyglycyl-glycine insoluble, traversant les filtres, mais englobées dans la précipitation acétique des flocons de pentaglycyl-glycine. J'ai pu en effet reproduire à volonté, en dissolvant par l'acide chlorhydrique concentré et reprécipitant dans l'eau des échantillons *purs* de cyclo-polyglycyl-glycine, ces suspensions opalescentes, extrêmement fines, et indéfiniment stables.

D'autre part il suffit de traiter par le noir animal ou par l'alumine gélatineuse les solutions de pentaglycyl-glycine rendues opalescentes par les fins granules de cyclo-polyglycyl-glycine, pour agglomérer ces granules et obtenir par filtration une *solution limpide de pentaglycyl-glycine*, solution ammoniacale dont l'évaporation ou la neutralisation acétique précipite le polypeptide pur.

Propriétés de la pentaglycyl-glycine. — La substance dont il s'agit et qui va être reconnue pour la pentaglycyl-glycine, se caractérise par son insolubilité pratique dans l'eau, même bouillante, sa solubilité par addition d'un peu de soude ou d'ammoniaque. Lorsqu'on chasse l'ammoniaque par l'ébullition, ou qu'on la neutralise par l'acide acétique, la substance est reprécipitée. Mise en suspension dans l'eau, et bouillie avec de l'oxyde cuivrique précipité, elle ne semble pas le dissoudre, ce qui s'explique suffisamment par sa propre insolubilité. L'addition de CuSO_4 à la solution sodique ou ammoniacale développe une magnifique coloration biurétique rose carmin.

Analyse centésimale. — La substance pulvérisée a été séchée à 110° jusqu'à poids constant.

I. — Substance : 0 gr. 2610. — CO_2 : 0 gr. 3812. — H_2O : 0 gr. 1360. — C = 39,85 0/0. — H = 5,79 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 1956. — CO_2 : 0 gr. 2841. — H_2O : 0 gr. 0986. — C = 39,62 0/0. — H = 5,62 0/0.

III. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1187. — Azote dégagé : 22 cc. 8 à 15° et 760,7 mm. (16°) = 26 mgr. 5392. — N = 22,36 0/0.

IV. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 4350. — Azote dégagé : 26 cc. 2 à 17° et 759,2 mm. (22°) = 30 mgr. 4262. — N = 22,32 0/0.

V. — Méthode Kjehl Dahl. Substance : 0 gr. 4454. — NH_3 quart-normal recueilli : 7 cc. 60, contenant 0 gr. 02660 de N. — N = 23,44 0/0.

VI. — Méthode Kjehl Dahl. Substance : 0 gr. 4325. — NH_3 quart-normal recueilli : 8 cc. 80, contenant 0 gr. 03080 de N. — N = 23,25 0/0.

On voit que, dans le cas actuel comme dans celui de la triglycyl-glycine, la méthode Dumas donne des chiffres d'azote inférieurs à ceux de la méthode Kjehl Dahl ; cela résulte encore de la difficulté d'exécution de la méthode Dumas sur un corps de combustion assez pénible, et il suffira de se reporter à ce qui a été dit à ce sujet au chapitre de la *Triglycyl-glycine*.

Nous laisserons donc de côté, comme suspects, les chiffres obtenus par la méthode Dumas, et la composition centésimale de la substance étudiée s'exprime dans le tableau suivant :

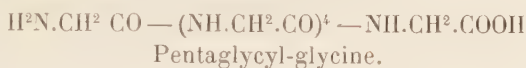
THÉORIE pour $\text{C}^{12}\text{H}^{20}\text{N}^6\text{O}^7$		ANALYSE			
		I	II	V	VI
$\text{C}^{12} = 444$	40,00	39,85	39,62	—	—
$\text{H}^{20} = 20$	5,56	5,79	5,62	—	—
$\text{N}^6 = 84$	23,33	—	—	23,44	23,25
$\text{O}^7 = 112$	—	—	—	—	—
360	100,00				

Constitution de la pentaglycyl-glycine. — Le fait que la substance, insoluble dans l'eau, se dissout aisément dans l'ammoniaque, même étendue, permet de penser que cette dissolution résulte d'une salification stable en présence d'un grand excès d'eau, et que cette salification porterait sur une chaîne à extrémités libres. La première idée qui se présente à l'esprit est donc de rechercher si le corps, qui offre avec une grande intensité la réaction du biuret, ne serait pas un terme de la série des enchaînements glycyliques à extrémités libres.

La composition centésimale répond très exactement à la formule $\text{C}^{12}\text{H}^{20}\text{N}^6\text{O}^7$, qui est celle de l'hexapeptide, la *pentaglycyl-glycine*. D'autre part, si pour plus de précision on se reporte (page 72) au tableau de la composition des chaînes polyglycyliques successives, on constate que le carbone de notre substance (39,85 0/0 ou 39,62 0/0) se place très

exactement entre la tétraglycyl-glycine (39,60 0/0) et la pentaglycyl-glycine (40,00 0/0) : les chiffres expérimentaux étant erronés par défaut, leur interprétation conduit, sans conteste possible, à la pentaglycyl-glycine. Les chiffres trouvés pour l'azote (23,11 0/0 et 23,25 0/0) se placent également juste entre la tétraglycyl-glycine (23,10 0/0) et la pentaglycyl-glycine (23,33 0/0) et conduisent, pour la même raison, à la pentaglycyl-glycine.

Le corps me paraît donc bien identifié par lui-même, intrinsèquement, et sans qu'il soit besoin de rechercher dans la littérature des termes de comparaison, à la *pentaglycyl-glycine* :



Comparaison de la pentaglycyl-glycine nouvellement préparée avec la pentaglycyl-glycine de E. Fischer. — La littérature comportant déjà une préparation et une description de pentaglycyl-glycine (E. FISCHER), je n'ai pas manqué de profiter après coup de cette heureuse circonstance, afin de voir si cette description serait de nature à corroborer ou à infirmer ma propre détermination intrinsèque.

E. FISCHER (1) chauffe à 100°, en couche mince, le *diglycyl-glycinate de méthyle* $\text{H}^2\text{N}.\text{CH}^2.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOCH}^3$, qui dans l'espace d'une demi heure (pour des échantillons de 2-3 gr.) se condense : deux de ses molécules s'associent en perdant une molécule d'alcool méthylique et formant le pentaglycyl-glycinate de méthyle $\text{H}^2\text{N}.\text{CH}^2.\text{CO} - (\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO})^4 - \text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOCH}^3$. On traite le produit par 7 fois son poids d'eau bouillante, qui laisse un résidu amorphe très finement divisé (formé sans doute d'une substance encore plus condensée), et on filtre chaud : par refroidissement le pentaglycyl-glycinate de méthyle se sépare sous forme d'une masse blanche épaisse qu'on purifie par redissolution dans l'eau bouillante.

Le *pentaglycyl-glycinate de méthyle* est finement divisé dans 5 fois son poids d'eau (par chauffage jusqu'à l'ébullition et refroidissement), puis on ajoute 1 1/4 molécule de soude concentrée, et on agite 1/2-1 heure à température ordinaire. La saponification se produit, et la pentaglycyl-glycine passe en solution dans la soude, mais il reste une petite quantité d'une substance amorphe, inattaquable, et difficile à séparer

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XIV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 453, 1906).

par filtration; on ajoute donc directement un peu plus que la quantité calculée d'acide acétique, et l'hexapeptide apparaît sous forme d'un volumineux précipité. Pour le purifier on le dissout dans l'ammoniaque étendue chaude, qui laisse indissous le corps étranger amorphe; pour faciliter la filtration, on ajoute un peu de noir animal, on fait bouillir et on filtre. Le filtrat incolore clair est évaporé jusqu'à ce que l'ammoniaque soit presque entièrement chassée: la *pentaglycyl-glycine* se précipite sous forme d'une poudre blanche granuleuse, qu'on recueille après refroidissement complet. On recommence la purification par l'ammoniaque étendue, on lave à l'eau et à l'alcool, on sèche d'abord dans un exsiccateur à vide et finalement dans le vide à 100°.

Voici les propriétés signalées par E. FISCHER. La *pentaglycyl-glycine* n'a pas de point de fusion: dans un tube capillaire elle commence à brunir vers 256° corr., et à température plus élevée elle se décompose complètement sans fondre. Elle est insoluble dans l'alcool et très difficilement soluble dans l'eau même à chaud. De sa solution dans l'ammoniaque étendue la *pentaglycyl-glycine* se précipite, lorsqu'on chasse l'ammoniaque par ébullition, sous forme d'une poudre granuleuse assez dense, qui ne montre aucune forme cristalline nette. Elle est très facilement soluble dans les alcalis dilués, et cette solution donne avec les sels de cuivre une très forte réaction du biuret.

La *pentaglycyl-glycine* se dissout dans les acides minéraux dilués, surtout si l'on chauffe modérément. « Parmi les sels qui prennent alors naissance, le *nitrate* est le plus beau, car il *cristallise* par refroidissement en jolies petites aiguilles microscopiques, qui sont formées de molécules égales du peptide et d'acide nitrique. Pour sa préparation 1 gr. de *pentaglycyl-glycine* fut dissous dans 5 cc. d'eau et 1,3 cc. d'acide nitrique de densité 1,17, à chaud; par refroidissement commença bientôt la cristallisation, et après un repos d'une heure à 0° la séparation était si complète que le rendement atteignait 1 gr., soit 85 0/0 de la théorie... Chauffé rapidement dans un tube capillaire, le sel fond vers 240° corr. avec fort dégagement gazeux, après être d'abord devenu jaune ». Le dosage du carbone et celui de l'acide nitrique concordent avec la formule $C^{12}H^{20}N^6O^7 \cdot HNO^3$.

On voit que les propriétés de la substance obtenue dans mes propres recherches concordent exactement avec celles que décrit E. FISCHER. Une seule m'avait échappé, la formation intéressante du *nitrate*: j'ai donc voulu voir si la coïncidence se poursuivrait sur ce point. Dans ce but j'ai pris un petit échantillon de *pentaglycyl-glycine* pure qui avait servi aux analyses centésimales et dont il restait quelques centigrammes: en le plaçant dans un petit tube et lui ajoutant goutte à goutte de

l'acide nitrique dilué suivant les indications de E. FISCHER, je suis arrivé à le dissoudre intégralement à l'ébullition. Dès que l'ébullition est suspendue le liquide se trouble, et il y apparaît des nuages de parcelles solides, qui au microscope m'ont paru formées de lamelles cristallines minces et allongées, mais sans qu'il fût possible d'y reconnaître des formes assez nettes pour la description.

N'ayant pas obtenu le nouveau corps en quantité suffisante, je n'ai pu en faire l'analyse : je ne puis donc affirmer qu'il s'agissait bien de nitrate de pentaglycyl-glycine ; mais ce que je puis dire avec certitude, c'est que le corps diffère de la pentaglycyl-glycine elle-même, et que les circonstances de sa formation correspondent qualitativement à celles qui ont été signalées par E. FISCHER pour le nitrate.

Il n'existe donc dans mon esprit aucun doute sur l'identité de ma pentaglycyl-glycine avec celle de E. FISCHER.

Interprétations possibles de la formation de pentaglycyl-glycine. — Voici donc que la condensation du glycocolle par la méthode à la glycérine, après nous avoir fourni simultanément un *dipeptide* cyclique, la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine) et un *tétrapeptide*, la triglycyl-glycine, nous donne encore maintenant un *hexapeptide*, la pentaglycyl-glycine. Il est très curieux de remarquer que tous ces polypeptides sont de *rang pair*, chaque stade de la condensation faisant entrer à la fois dans la molécule *deux groupements glycyliques*. Nous allons retrouver tout à l'heure encore un nouvel exemple de cette loi dans la cyclo-polyglycyl-glycine, à laquelle je me contente d'attribuer ici la désignation « poly », faute d'avoir pu jusqu'à présent déterminer le nombre de ses chaînons glycyliques, mais dans la constitution de laquelle nous devons admettre, d'après son mode de formation, la présence de *4n* groupes glycyliques, probablement 8, un *nombre pair* en tous cas.

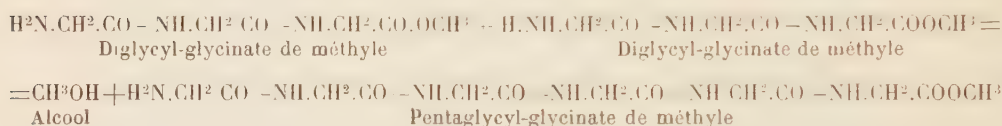
Il est intéressant de rapprocher cette remarque de celle que nous avons faite dans l'*Introduction* au sujet des chaînes benzoylées de TH. CURTIUS : nous avons observé que parmi les termes successifs de la série, les seuls, outre l'acide hippurique, dont la détermination présente des caractères d'authenticité satisfaisants, sont précisément ceux de *rang pair* :

Benzoyl-glycyl-glycine	(rang 2)
Benzoyl-triglycyl-glycine	(rang 4)
Benzoyl-pentaglycyl-glycine	(rang 6)

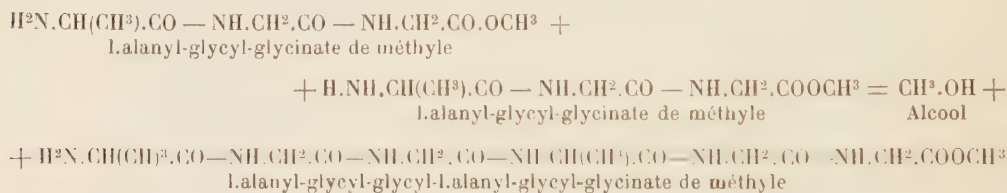
Lorsque le glycinat d'éthyle subit la condensation spontanée, il se

transforme en deux corps dont l'un est le *dipeptide* cyclique (2.5. diacipipérazine) et dont l'autre dérive encore d'un peptide de rang *pair* : c'est la « Biurethase » de TH. CURTIS, éther éthylique de la triglycyl-glycine.

Enfin si la belle méthode de construction fragmentaire de E. FISCHER permet d'obtenir des polypeptides de rang quelconque, impair aussi bien que pair, on voit des dérivés de polypeptides impairs, abandonnés à la condensation spontanée, aboutir encore à des dérivés de polypeptides *pairs*. Le diglycyl-glycinate de méthyle (ou d'éthyle), dérivé de tripeptide, maintenu à 100°, double sa chaîne pour donner un dérivé de rang 6 = 3 × 2. le pentaglycyl-glycinate de méthyle (ou d'éthyle), avec régénération d'une molécule d'alcool (E. FISCHER (1) :



Dans les mêmes conditions (fusion et séjour à 100°), le l. alanyl-glycyl-glycinate de méthyle, éther de tripeptide, subit la même condensation en éther d'hexapeptide (E. FISCHER (2)).



Il n'est pas possible qu'une coïncidence aussi persistante soit fortuite : elle doit traduire des conditions d'équilibre particulières des molécules aminées (ou tout au moins des molécules glyciques), dont il faudra tenir compte en étudiant les conditions naturelles de l'enchaînement des aminoacides, et notamment dans les recherches biologiques.

Je me suis tout d'abord demandé si la synthèse de toutes ces chaînes

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XIV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 453, 1906).

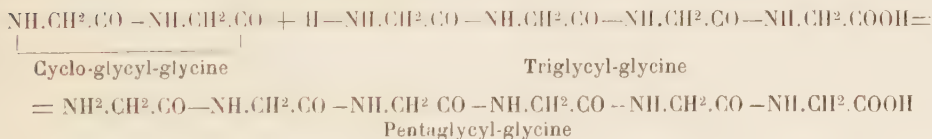
2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 2893, 1906).

paires ne résulterait pas d'une formation initiale de glycyl-glycine, dont pourraient dériver tous les autres polypeptides, soit par soudure linéaire, soit par fermeture intrinsèque (cyclo-glycyl-glycine). Un chapitre spécial a été consacré à la *Recherche de la glycyl-glycine* dans les premiers temps de la condensation, et je n'ai pu observer le moindre indice qui permît de croire à la présence de ce corps.

D'ailleurs il est important de remarquer que l'apparition de la pentaglycyl-glycine est un phénomène *secondaire*, car on ne trouve pas cet hexapeptide parmi les produits directs du chauffage du glyco-colle en présence de la glycérine, tels qu'ils sortent du vase à réaction.

Chaque fois que j'ai constaté l'apparition de la pentaglycyl-glycine, on la *voyait* prendre naissance au sein d'une solution aqueuse chaude et d'abord parfaitement limpide, qui contenait de la matière biurétique soluble et d'où l'on pouvait isoler de la triglycyl-glycine. De plus, chaque fois que les solutions biurétiques donnaient naissance à des flocons de pentaglycyl glycine, elles renfermaient aussi de la cyclo-glycyl-glycine, et la production des flocons cessait quand le cyclo-dipeptide avait été éliminé.

L'idée la plus simple qui se présente à l'esprit est donc que, des 6 chaînons glycyloxydes de l'hexapeptide, 4 seraient apportés par la molécule de la triglycyl-glycine, et les 2 autres par une molécule de cyclo-glycyl-glycine, de telle sorte que la synthèse pourrait se représenter par une équation telle que celle-ci :



Ce mode de réaction supposerait l'ouverture du cycle dikétopipérazique et l'union linéaire des deux molécules, par addition pure et simple, sans hydratation ni déshydratation. Si ce mécanisme se confirmait, et s'il existait des analogies réelles entre la formation des flocons de pentaglycyl-glycine au sein de la solution chaude et la *coagulation des albumines*, nous serions conduits à des aperçus nouveaux et inattendus sur la nature de ce phénomène. La coagulation des albumines par la chaleur ne consisterait ni en une fragmentation de la molécule, ni en une isomérisation par migration de groupes atomiques (comme on l'entend dire quelquefois), mais bien en une synthèse de molécules insolubles, plus condensées que les albumines naturelles, par combinaison de plusieurs molécules solubles parce que moins condensées.

Je me garderai bien toutefois de me prétendre en mesure d'apporter dès aujourd'hui la lumière complète sur le mécanisme de cette formation secondaire, si intéressante à divers points de vue, de la pentaglycyl-glycine. Je tiens au contraire à dire qu'il reste encore des points obscurs. Ainsi il m'est arrivé de ne pouvoir réussir, en certains cas, la préparation de la pentaglycyl-glycine, et de maintenir en vain au bain-marie des solutions aqueuses pourtant riches en triglycyl-glycine et en cyclo-glycyl-glycine. Quelle était la cause de cet insuccès ? J'ai remarqué qu'il s'était produit sur des préparations où on avait apporté un soin particulièrement méticuleux à l'élimination de toute trace de glycérine. Le magma de précipitation alcoolique avait été broyé finement avec un peu d'alcool absolu plusieurs fois renouvelé, et on n'avait arrêté ces épuisements qu'après avoir bien constaté qu'un volume notable de l'alcool de lavage (100-200 cc.) ne laissait plus trace de glycérine à l'évaporation.

Il se pourrait donc que la glycérine fût nécessaire à la synthèse de la pentaglycyl-glycine, et cela peut se concevoir de deux façons au moins. Ou bien la glycérine interviendrait en tant que molécule auxiliaire, mais distincte, présente à l'état de simple mélange. Ou bien le corps qui donne naissance à l'hexapeptide ne serait pas en réalité la triglycyl-glycine libre elle-même, mais bien celle-ci à l'état de combinaison avec la glycérine, à l'état d'éther glycérique, ce qui s'accorderait parfaitement avec une conception que j'exposerai plus loin. On comprendrait qu'un lavage rapide et sommaire de la glycérine en excès laissât subsister sans rupture un éther glycérique de la triglycyl-glycine ; tandis qu'un séjour prolongé dans l'alcool sans cesse renouvelé c'est-à-dire éliminant sans cesse la glycérine qui pourrait faire équilibre à la rupture de l'éther, pourrait détruire toute combinaison glycérique de la triglycyl-glycine. On aurait alors la raison de l'échec éprouvé avec un produit trop bien débarrassé de la glycérine.

Des questions très intéressantes, on le voit, se posent encore ici ; je me propose de reprendre ultérieurement, s'il se peut, l'étude du mécanisme de formation de la pentaglycyl-glycine, pour examiner l'influence de la glycérine, des acides aminés et des polypeptides, des substances minérales, etc.

CHAPITRE VI

PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE : CYCLO-POLYGLYCYL-GLYCINE

Isolement de la cyclo-polyglycyl-glycine par simples lavages. — On a vu déjà dans le premier chapitre, consacré à la description sommaire de l'*Action de la glycérine sur le glyocolle*, que dans la dernière période de cette action apparaissent au sein de la glycérine des granulations fines d'une substance insoluble dans l'alcool, dans l'eau froide ou bouillante, et même dans l'ammoniaque bouillante. On verra plus loin, dans un chapitre de déterminations quantitatives, tout entier consacré à la *Marche de la réaction peptidogène*, que cette substance si résistante ne commence à prendre naissance qu'après disparition de la totalité du glyocolle, et à mesure que la triglycyl-glycine déjà formée disparaît à son tour. Il faut donc, pour l'obtenir en quantité aussi grande que possible, prolonger le chauffage pendant longtemps ; le mieux est d'attendre jusqu'à disparition de toute la triglycyl-glycine, c'est-à-dire jusqu'au moment où un échantillon de la masse glycérinée, repris par l'eau, ne dissout plus trace d'oxyde cuivrique précipité, et ne donne plus la réaction du biuret.

D'autre part, dans un chapitre ultérieur consacré à l'*Influence de la proportion de glycérine*, on verra encore que plus l'on restreint la proportion de la glycérine par rapport au glyocolle, plus l'on diminue la fraction du glyocolle se transformant en cyclo-glycyl-glycine, et plus on augmente au contraire celle qui aboutit à la cyclo-polyglycyl-glycine, en passant par la triglycyl-glycine. On dissoudra donc le glyocolle dans le minimum d'eau bouillante, et on ajoutera 2 1/2-3 fois son poids de glycérine à 30° B., proportion au-dessous de laquelle il est bon de ne pas descendre si l'on veut assurer une solubilisation suffisante du glyocolle et une consistance suffisamment maniable du mélange. On

maintient à 170°-175° jusqu'à ce qu'une prise d'essai ait complètement perdu la faculté de dissoudre l'oxyde cuivrique précipité

D'ailleurs, même dans le cas où la réaction n'aurait pas été poussée au maximum, il est facile d'extraire du mélange la quantité de cyclo-polyglycyl-glycine qu'il peut contenir, et cela sans rien changer à la technique de séparation.

La masse refroidie est délayée dans l'alcool absolu (ou l'alcool à 96°) pour élimination de la glycérine, comme on l'a vu pour la préparation de la cyclo-glycyl-glycine et de la triglycyl-glycine, puis le résidu insoluble, s'il contient encore de la triglycyl-glycine que l'on veuille isoler, est soumis à l'épuisement méthodique par l'alcool à 80° chaud, comme on l'a vu au chapitre *Triglycyl-glycine*. Après cet épuisement, ou directement si l'on ne s'occupe pas de la triglycyl-glycine, le résidu est repris par l'eau bouillante et centrifugé. L'épuisement aqueux élimine s'il y a lieu la cyclo-glycyl-glycine et la triglycyl-glycine, ainsi qu'une grande partie de la matière brune ; le culot de centrifugation est formé d'une masse pulvérulente, brun clair, qui se remet facilement en suspension dans l'eau sous forme de tourbillons de sphérules chatoyants rappelant ceux de la triglycyl-glycine, sauf qu'ils sont insolubles. Lorsque des épuisements répétés par l'eau bouillante ne paraissent plus agir sensiblement sur le résidu insoluble, on épuise celui-ci par de l'eau bouillante additionnée d'environ 1/4 de son volume d'ammoniaque (solution pure commerciale) : l'eau ammoniacale enlève au produit une quantité appréciable de matière brune, et généralement un peu de pentaglycyl-glycine qui a pu se former en quantité plus ou moins grande, pendant les manipulations, aux dépens de la triglycyl-glycine et de la cyclo-glycyl-glycine. (Il est facile de récupérer cette pentaglycyl-glycine en la précipitant par neutralisation acétique des lavages ammoniacaux).

Chaque lavage ammoniacal enlève au résidu un peu de matière brune, et la coloration du produit baisse à chaque fois. Cependant, pour arriver à une décoloration parfaite, il faudrait une interminable série d'épuisements, ce qui n'est pas facile à réaliser, car, à ce degré de purification, les granulations de cyclo-polyglycyl-glycine se centrifugent mal. Aussi mes échantillons ont-ils conservé généralement une légère teinte écruë, à peine perceptible quelquefois ; cette légère teinte n'est due évidemment qu'à des traces de matière brune qui adhèrent avec une grande ténacité à la substance fondamentale. Il est bien certain que celle-ci est blanche.

La plupart des échantillons que j'ai étudiés n'avaient pas subi d'autre purification que cette série nombreuse de lavages, car je n'avais d'abord

trouvé aucun moyen de dissoudre la substance en vue de sa purification. C'est à ce produit simplement isolé par lavages que se rapportent la plupart des analyses centésimales que l'on trouvera plus loin.

Purification par dissolution à froid dans les acides minéraux concentrés. — Cependant j'ai découvert plus tard que la substance se dissout avec une grande facilité, à froid, dans les acides minéraux concentrés (chlorhydrique, sulfurique, nitrique), et reprécipite inaltérée lorsqu'on verse ces dissolutions dans un excès d'eau. Ici comme en d'autres circonstances, on est porté à se défier de l'acide nitrique, à cause de ses propriétés oxydantes. Quant à l'acide sulfurique concentré, il a le léger inconvénient d'agglomérer, dès le premier contact, la substance en pelotons dont la dissolution, très rapide à chaud, n'est qu'assez lente à froid ; or il est plus prudent de ne pas chauffer, par crainte d'hydrolyse. Au contraire l'*acide chlorhydrique* pur, tel que le fournit le commerce, dissout très aisément le corps à froid, en quelques minutes, sans l'agglomérer. C'est ce réactif que l'on choisira de préférence.

La solution chlorhydrique se centrifuge très bien, ou peut même être filtrée à la trompe sur papier durci, ce qui permet d'éliminer les quelques poussières qui seraient en suspension. Aussitôt qu'on le peut, on verse la solution chlorhydrique dans un excès d'eau distillée, ou mieux d'eau ammoniacale qui retient mieux la matière jaune accompagnant la substance : celle-ci se précipite en granulations blanches très fines, qu'on peut recueillir par centrifugation ou par filtration à la trompe. Toutefois on perd ainsi une partie de la substance, dont les granules ténus sont en suspension si fine qu'ils traversent partiellement les filtres et résistent même dans une certaine mesure à la centrifugation. Il est donc utile d'ajouter à la suspension 1 ou 2 volumes d'alcool, ce qui détermine l'agglomération des granules en épais flocons blancs, dont le recueil sur filtre durci, à la trompe, est très facile. On termine par lavages à l'alcool, puis à l'éther, et l'on sèche.

L'étude des propriétés, et l'analyse centésimale, ont montré que la substance n'a été en rien altérée par ce traitement.

Isolement rapide par dissolution chlorhydrique. — On peut même profiter des propriétés de la substance pour l'isoler très rapidement. Si l'on reprend par l'eau l'ensemble des produits de transformation du glycolle, après élimination de la glycérine par lavage alcoolique, ou même sans cette précaution, tout se dissout sauf la cyclo-polyglycyl-glycine. On fait digérer quelque temps au bain-marie

avec du noir animal, qui fixe non seulement la matière colorante, mais aussi les granulations de cyclo-polyglycyl-glycine ; on filtre à la trompe. Le noir animal est détaché du filtre, desséché, délayé dans l'acide chlorhydrique concentré ; on filtre à la trompe sur papier durci, et la solution chlorhydrique qui passe, colorée en brun, est versée dans un excès d'eau ammoniacale. La cyclo-polyglycyl-glycine qui se précipite alors est déjà presque entièrement décolorée ; en la recueillant, la séchant, et renouvelant le traitement chlorhydrique, on peut l'obtenir blanche.

Ce procédé permet maintenant de se procurer très facilement, et en abondance, la cyclo-polyglycyl-glycine.

Propriétés de la cyclo-polyglycyl-glycine. — La substance chauffée ne fond pas, mais charbonne, puis brûle en dégageant une forte odeur de corne brûlée.

Elle est insoluble dans l'eau, même bouillante ; elle retient assez fortement l'eau qui l'imprègne, et une fois desséchée elle reprend assez facilement de l'humidité à l'atmosphère. Elle est insoluble dans l'alcool et dans l'éther.

La substance est insoluble à froid dans les acides minéraux moyennement étendus (acides chlorhydrique, sulfurique, nitrique, du commerce, dilués au quart) ; même après trois jours de contact la matière insoluble ne paraît pas avoir diminué de quantité, et le liquide surnageant, décanté, ne contient pas trace de substance biurétique. Les mêmes acides minéraux étendus attaquent à *chaud* la substance, très lentement d'ailleurs : il faut des heures pour en obtenir la disparition, avec régénération du glycocolle par hydrolyse. La solution sulfurique, par exemple, traitée par la baryte jusqu'à presque neutralisation, puis bouillie avec une pincée de carbonate de baryum, et filtrée, dissout abondamment l'oxyde cuivrique précipité : le liquide, bleu foncé, laisse cristalliser par refroidissement les fines aiguilles du glycocollate de cuivre.

Jusqu'ici les propriétés de la substance concordent exactement avec la description qu'a donnée L. BALBIANO (1) de son anhydride « corné » ; mais en opérant avec les acides minéraux *concentrés*, j'ai constaté une facilité de dissolution plus grande encore que ne l'indique cet auteur. C'est ainsi que d'après L. BALBIANO l'acide chlorhydrique fumant du commerce, agissant sur l'anhydride « corné » à la température ordinaire, produit la dissolution complète en 10 heures, en une demi-heure

1. L. BALBIANO. Sopra una nuova anidride della glicocolla (*Gazz. chim. ital.*, 32, I, 440, 1902).

à chaud ; évaporant au bain-marie, l'auteur a trouvé que la substance avait été intégralement hydrolysée en glycocolle. Or j'ai découvert que ma substance, que je possédais, il est vrai, à l'état pulvérulent très finement divisé, se dissout dans l'acide chlorhydrique pur du commerce, en *quelques minutes seulement à froid*. De plus, l'hydrolyse n'a pas lieu lors de la dissolution, *qui laisse inaltérée la cyclo-polyglycyl-glycine* : si dès la dissolution effectuée on verse le liquide dans un grand excès d'eau, puis qu'on prélève *instantanément* un essai de la solution pour y tenter la réaction du biuret, on obtient une belle coloration rose ; il semblerait donc que la substance primitive s'est transformée, non pas d'ailleurs en glycocolle par hydrolyse complète, mais simplement en un corps polyglycylique soluble, par hydrolyse partielle. Il n'en est même rien, car au bout de quelques instants on voit la dilution aqueuse se troubler, avec réapparition des petits sphérules légers, dont l'agitation produit les tourbillons nacrés caractéristiques de la cyclo-polyglycyl-glycine originelle : le liquide clarifié par décantation a perdu en même temps la propriété de donner la réaction du biuret. Cette propriété n'appartenait donc pas à un produit d'ouverture ou d'hydrolyse de la molécule de cyclo-polyglycyl-glycine, mais bien à cette molécule elle-même, temporairement solubilisée par combinaison avec l'acide ; il s'agit probablement d'un chlorhydrate facilement dissociable par l'eau, dont la décomposition remet en liberté la substance inaltérée, absolument comme la combinaison sulfurique de l'indigotine remet en liberté ce corps lorsqu'on la verse dans un excès d'eau.

J'ai constaté que l'acide sulfurique et l'acide nitrique concentrés dissolvent, eux aussi, la cyclo-polyglycyl-glycine, rapidement à froid, instantanément si l'on chauffe légèrement ; la solution acide, versée aussitôt dans un grand excès d'eau, donne la réaction du biuret si on l'étudie à l'instant même, puis se trouble au bout de quelques instants en laissant précipiter la cyclo-polyglycyl-glycine régénérée, tandis que le liquide clarifié ne donne plus la réaction du biuret. Je me suis assuré, dans le cas de chacun des trois acides, que la substance régénérée est bien identique au point de départ, insoluble dans l'ammoniaque étendue bouillante, etc... La dissolution à froid dans les acides minéraux concentrés, avec reprécipitation par l'eau, peut donc être appliquée à la purification de la cyclo-polyglycyl-glycine : l'acide *chlorhydrique* est le plus recommandable pour cet usage.

Quelques rapides essais préliminaires ont semblé montrer que le contact plus prolongé des acides minéraux concentrés (ou même modérément dilués) attaque la molécule de cyclo-polyglycyl-glycine, mais que l'hydrolyse, au lieu d'aboutir d'emblée au glycocolle, peut passer, dans

certaines conditions, par un stade intermédiaire de polypeptide soluble biurétique, dont l'isolement et l'étude permettraient peut-être de déterminer la dernière inconnue (grandeur moléculaire) qui reste dans la constitution de la cyclo-polyglycyl-glycine. J'espère pouvoir reprendre et résoudre la question.

L'acide acétique cristallisable ne dissout la cyclo-polyglycyl-glycine, ni à froid, ni à chaud.

La soude, même à l'état de lessive concentrée, n'attaque pas à froid la cyclo-polyglycyl-glycine, au moins dans les premiers temps. Si à une suspension du corps dans la soude on ajoute un peu de sel cuivrique, on n'observe au premier contact qu'une coloration bleue, et il faut quelques instants pour voir la coloration virer progressivement au rose. Ceci résulte sans doute du temps nécessaire à la fixation du cuivre sur les granulations de la cyclo-polyglycyl-glycine qui est par elle-même un corps biurétique ; la lenteur et le développement progressif de la réaction du biuret ne résultent pas, comme on pourrait le croire, d'une attaque progressive de la cyclo-polyglycyl-glycine par la soude, car une suspension dans la soude préparée depuis une heure ou plus montre exactement le même phénomène.

Cependant si l'on abandonne pendant 24 heures à température ordinaire une suspension de cyclo-polyglycyl-glycine dans la soude assez concentrée, on remarque que le précipité a notablement diminué de volume, et l'on peut séparer par décantation un liquide parfaitement limpide où l'addition du cuivre produit instantanément la coloration rose. Le contact prolongé avec l'alcali a donc fait passer en solution un polypeptide biurétique, et peut-être par cette voie aussi pourra-t-on obtenir des indications sur la grandeur moléculaire de la cyclo-polyglycyl-glycine.

Si l'on *chauffe* la cyclo-polyglycyl-glycine en présence de soude concentrée, la dissolution complète est immédiate ; mais, même en refroidissant instantanément le liquide alcalin, on n'y trouve plus trace de substance biurétique : le cuivre, dès la première goutte, y produit la coloration bleu céleste du glycocolle libre. Neutralisée par HCl ou CH_3COOH , la solution dissout abondamment à chaud l'oxyde cuivrique précipité, en un liquide bleu foncé. La désintégration de la molécule est donc allée, ici, d'emblée jusqu'au glycocolle.

L'ammoniaque à 22° B. ne dissout la cyclo-polyglycyl-glycine ni à froid ni à chaud. Même après 4 jours de contact (à froid) la substance n'a subi aucun changement visible, et le liquide ne renferme pas trace de corps biurétique.

La cyclo-polyglycyl-glycine possède une *tendance remarquable à se*

remettre en suspension dans l'eau, et cela d'autant plus volontiers qu'elle est plus pure. Lorsqu'on l'a purifiée presque entièrement par une série de lavages antérieurs, les derniers lavages aqueux se présentent sous l'aspect de liquides blancs très opalescents ; les fines particules suspendues sont accessibles à la vision, car l'agitation produit dans ces liquides des tourbillons de poussières chatoyantes, mais on n'arrive à recueillir ces particules ni par filtration réitérée sur papier, ni par centrifugation pendant 1 heure à 3.000 tours par minute, ni par repos prolongé pendant des semaines.

L'addition de 1-2 volumes d'alcool à ces suspensions opalescentes précipite aussitôt toute la matière à l'état de flocons blancs qui s'agglomèrent au sein d'une eau-mère parfaitement limpide et dépouillée de toute trace de substance. Chauffées un instant avec un peu d'alumine gélatineuse lavée, ces suspensions opalescentes laissent flocculer aussitôt la totalité de la matière, et le liquide, filtré, est d'une limpidité parfaite. Enfin les particules en suspension se fixent aisément aussi sur le *noir animal* ; la fixation est peut-être un peu moins parfaite que sur l'alumine, avec certaines variétés de noir au moins, mais l'ennui du lavage de l'alumine et la commodité d'emploi du noir feront souvent préférer ce dernier réactif lorsqu'il s'agit d'enlever à un liquide la cyclo-polyglycyl-glycine qu'il peut contenir en suspension.

Analyse centésimale. — Les analyses ont été exécutées d'abord sur un échantillon purifié seulement par la série des lavages, et qui, après 10 heures de dessiccation à 110°-113°, semblait parvenu à constance de poids.

I. — Substance : 0 gr. 2063. — CO_2 : 0 gr. 3089. — H_2O : 0 gr. 1098. — C = 40,84 0/0. — H = 5,91 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 2050. — CO_2 : 0 gr. 3086. — H_2O : 0 gr. 1076. — C = 41,07 0/0. — H = 5,85 0/0.

III. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1063. — Azote dégagé : 20 cc 9 à 17° et 762,8 mm. (17°) = 24 mgr. 1143. — N = 22,69 0/0.

IV. — Méthode Kjeldahl. Substance : 0 gr. 2063. — NH_3 quart-normal recueilli : 13 cc. 95, contenant 0 gr. 048825 N. — N = 23,67 0/0.

V. — Méthode Kjeldahl. Substance : 0 gr. 2021. — NH_3 quart-normal recueilli : 13 cc. 6, contenant 0 gr. 0476 N. — N = 23,55 0/0.

Sans s'éloigner beaucoup des chiffres qu'exigerait la composition d'une cyclo-polyglycyl-glycine ($-\text{NH}.\text{CH}_2.\text{CO}-$)_n, soit C = 42,11 0/0 et N = 24,56 0/0, les valeurs trouvées présentent avec la théorie un

écart qu'on préférerait ne pas rencontrer dans des recherches qui, pour les raisons déjà exposées, exigent une grande précision analytique.

Je me suis donc demandé si le corps était suffisamment pur. A la calcination, il laisse bien une trace de cendres, mais si infime qu'elle n'a pas été dosée et qu'elle ne saurait sans doute influer sur les chiffres d'analyse. En revanche, après avoir constaté la facilité avec laquelle le corps reprend l'humidité atmosphérique, je me suis demandé si la dessiccation à 110° avait été suffisante.

La substance supporte facilement une température plus élevée, puisqu'on la prépare précisément à 170° , 175° , 180° . Le même échantillon qui avait servi aux analyses précédentes a donc été maintenu à 180° pendant 10 heures, refroidi dans le vide sur H^2SO^4 , et les prises d'essai pour analyses ont été pesées aussitôt que le permettait le refroidissement. Voici les nouvelles analyses :

VI. — Substance : 0 gr. 2117. — CO^2 : 0 gr. 3200. — H^2O : 0 gr. 1045. — $\text{C} = 41,24$ 0/0. — $\text{H} = 5,48$ 0/0

VII. — Substance : 0 gr. 2050. — CO^2 : 0 gr. 3103. — H^2O : 0 gr. 0994. — $\text{C} = 41,28$ 0/0. — $\text{H} = 5,37$ 0/0.

VIII. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1033. — Azote dégagé : 20 cc. 65 à 16° et 766,2 mm. (16°) = 24 mgr. 1024. — $\text{N} = 23,33$ 0/0.

Enfin le dosage de l'azote a encore été exécuté, ultérieurement, sur un autre échantillon qui, incomplètement purifié par lavages, et de teinte jaune encore assez accentuée, avait été redissous dans HCl concentré, et précipité par l'eau, puis lavé à l'alcool et à l'éther, et séché à 180° :

IX. — Méthode Kjehtdahl. Substance : 0 gr. 2117. — NH^3 quart-normal recueilli : 14 cc. 0, contenant 0 gr. 0490 N. — $\text{N} = 23,15$ 0/0.

Ce chiffre est très comparable aux précédents, et joint à la conservation des propriétés, il confirme la régénération du corps inaltéré.

Si on rassemble les analyses exécutées dans les meilleures conditions, on obtient donc le tableau suivant :

THÉORIE pour $(C^2H^3NO)^n$		ANALYSE			
		VI	VII	IV	V
C ² = 24	42,11	41,24	41,28	—	—
H ³ = 3	5,26	5,48	5,37	—	—
N = 14	24,56	—	—	23,67	23,55
O = 16	—	—	—	—	—
57	100,00				

Il reste encore, pour le carbone, un écart de $-0,87$ ou $-0,83$; dans beaucoup de recherches de chimie organique, on n'aurait pas à y prêter attention, mais dans le présent travail on a vu quelle rigueur doit être apportée à la discussion des analyses, à cause de la composition si voisine des termes successifs.

Examinons donc la composition des chaînes polyglycyl-iques de plus en plus condensées, et poursuivons le tableau que nous avons donné au Chapitre I^{er}, en esquissant l'Action de la glycérine sur le glycolle. Nous aurons par exemple :

Enchaînement progressif des molécules de glycine. Composition centésimale des divers termes :

Termes successifs	Poids moléculaire	C 0/0	H 0/0	N 0/0
16. Pentadécaglycyl-glycine . . .	M = 930	41,29	5,38	24,09
18. Heptadécaglycyl-glycine . . .	M = 1044	41,38	5,36	24,14
20. Ennéadécaglycyl-glycine . . .	M = 1158	41,45	5,35	24,18
∞. Cyclo-glycyl-glycines. . . .	M = (114) ⁿ	42,11	5,26	24,56

Il est évident que pour identifier la substance analysée, il faut s'élever au moins jusqu'au 16^e terme de la série, la pentadécaglycyl-glycine (C = 41,29 0/0); mais nul n'oserait prétendre que les analyses ne sauraient s'appliquer tout aussi bien au 18^e terme, l'heptadécaglycyl-glycine (C = 41,38 0/0), au 20^e, l'ennéadécaglycyl-glycine (C = 41,45 0/0), ou même à des termes plus élevés. Il est parfaitement admissible de remonter jusqu'à la limite de la série, jusqu'à une cyclo-polyglycyl-

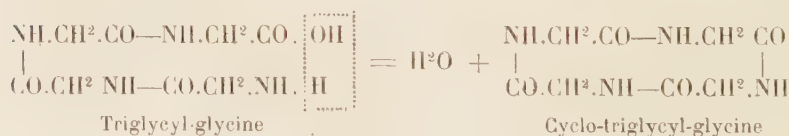
glycine ($-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO}-$)ⁿ, qui contient C = 42,41 0/0; il ne faut pas oublier que l'échantillon employé pour les analyses n'avait pu subir que des lavages, sans autre moyen de purification.

Constitution de la cyclo-polyglycyl-glycine. — On a vu que les analyses permettent de considérer le corps comme ayant la composition $(\text{C}^2\text{H}^3\text{NO})^n$, c'est-à-dire comme formé par l'enchaînement *cyclique* de n groupements glycyliques ($-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO}-$). Cependant la voie de l'analyse centésimale est impuissante à donner une certitude absolue, et ne peut exclure l'hypothèse d'une chaîne ouverte formée d'un très grand nombre de glycyles, 16 à 20 au moins.

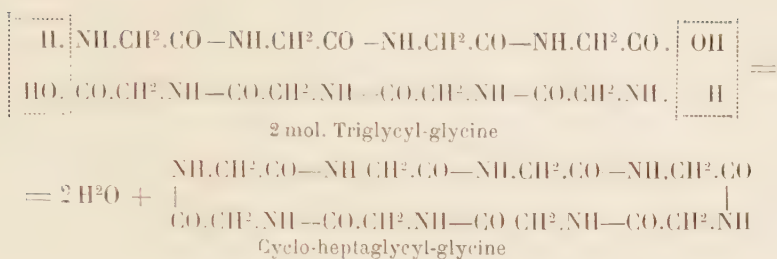
Mais, outre que la fermeture du cycle paraît plus vraisemblable que l'allongement aussi démesuré d'une chaîne ouverte, une raison expérimentale plaide en faveur de la structure cyclique. Le corps est rigoureusement insoluble dans les acides étendus et les alcalis étendus, ce qui se concilierait mal avec l'hypothèse de fonctions $-\text{NH}^2$ et $-\text{COOH}$ libres à l'extrémité d'une chaîne. A vrai dire le corps est soluble dans les acides minéraux *concentrés*, mais on sait par l'exemple de l'indigotine, de la leucinimide, et de bien d'autres substances, qu'un corps peut très bien se dissoudre dans ces conditions sans renfermer d'autres groupes salifiables que le chaînon $-\text{NH}-$ inclus dans un cycle. Ce serait précisément le cas de notre cyclo-polyglycyl-glycine ($-\text{NH}.\text{CH}^2.\text{CO}-$)ⁿ.

Quel serait le nombre n des groupements glycyles enchaînés dans le cycle moléculaire? On verra dans un chapitre ultérieur spécialement consacré à la *Marche de la réaction peptidogène*, que la cyclo-polyglycyl-glycine ne prend naissance, au sein de la glycérine, qu'après la triglycyl-glycine, et à mesure que celle-ci disparaît; la substance cyclique dérive donc de la triglycyl-glycine, et il est évident que le nombre n des glycyles enchaînés est un *multiple de 4*. Les deux modes les plus simples de cyclisation sont les suivants :

Ou bien la molécule de triglycyl-glycine se cycliserait sur elle-même, en rapprochant ses extrémités :



Ou bien deux molécules de triglycyl-glycine concourraient à la formation du cycle :



Je croirais très volontiers que le corps est en réalité l'octopeptide cyclique, c'est-à-dire la *cyclo-heptaglycyl-glycine* ($-\text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO}-$)⁸, pour les raisons suivantes. En premier lieu, l'union de deux molécules est fréquente dans la condensation des éthers de polypeptides, et on verra que les substances qui font l'objet du présent travail se forment vraisemblablement par voie d'éthérification transitoire. En second lieu, les propriétés du corps montrent qu'il s'agit d'une molécule plus condensée que la triglycyl-glycine, plus condensée même que la pentaglycyl glycine : l'octopeptide est donc la molécule la plus simple à laquelle on pourrait songer. Il est presque certain que nous avons affaire à la cyclo-heptaglycyl-glycine.

Néanmoins, par une réserve compréhensible, je me contenterai de la désigner provisoirement du nom de *cyclo-polyglycyl-glycine*, jusqu'à la preuve définitive. Il est possible que l'on puisse trouver cette preuve en étudiant les substances biurétiques qui paraissent se former, comme on l'a vu, dans l'attaque convenablement ménagée par les acides ou les alcalis. Si l'on n'isole, des produits de cette attaque, que de la triglycyl-glycine, on ne pourra conclure, car celle-ci pourrait provenir aussi bien de l'ouverture simple de la cyclo-triglycyl-glycine, que de la rupture double de la cyclo-heptaglycyl-glycine. Mais si l'on isole des polypeptides plus condensés, de l'heptaglycyl-glycine par exemple, on aura la preuve qu'il s'agissait bien d'un *octopeptide* cyclique.

CHAPITRE VII

PRODUITS DE CONDENSATION DU GLYCOCOLLE : MATIÈRE BRUNE, MATIÈRE ALCALOÏDIQUE

Propriétés de la matière brune. — Lorsque le chauffage du glycolle au sein de la glycérine est terminé, et que l'on délaye dans l'alcool la masse pâteuse, le liquide alcoolique décanté et filtré possède une coloration orangée ou rouge-acajou, avec fluorescence verte, qui rappelle tout à fait certaines huiles de vaseline employées pour le graissage des machines.

De plus, la masse insoluble dans l'alcool possède une coloration analogue à celle du chocolat ; lorsqu'on la redissout dans l'eau, on obtient un liquide brun très foncé, noirâtre, comparable à une infusion de café. Cette liqueur brune ne paraît pas fluorescente comme la solution alcoolique rougeâtre : tout au moins la légère fluorescence qu'elle montre quelquefois pourrait-elle être attribuée à un reste de la matière orangée précédente. Par digestion avec le noir animal, surtout à chaud, la liqueur brune abandonne la presque totalité de sa matière colorante ; elle conserve en général une légère coloration jaune-orangé, avec fluorescence verte, qu'il faut peut-être attribuer à la même substance qui colore le lavage alcoolique.

Il est donc possible qu'il y ait deux matières colorantes : l'une, orangée, à fluorescence verte, peu abondante, soluble dans l'alcool et dans l'eau ; l'autre brune, très soluble dans l'eau, difficilement soluble dans l'alcool. Je fais d'ailleurs encore toutes réserves sur la validité de cette distinction. Dans tous les cas, la seconde substance seule intervient en quantité notable.

La matière brune, azotée, dérive de la cyclo glycyl-glycine. — On a vu déjà, dans le premier chapitre, que les premières recherches consacrées à l'*Action de la glycérine sur le glycolle* avaient conduit à une

double notion : 1^o la matière brune ne dérive pas directement du glyco-colle, ne prenant naissance qu'après la disparition de celui-ci ; 2^o la matière brune se formerait vraisemblablement aux dépens de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) qui diminue à mesure que la matière brune augmente.

On retrouvera plus loin, dans un chapitre spécial consacré à la *Marche de la réaction peptidogène*, le développement de ces notions. Dans les 5 premières heures de séjour à 175° au sein de la glycérine, l'eau de dissolution s'est échappée progressivement, mais le mélange s'est à peine coloré, et le glyco-colle n'a disparu que pour une fraction de 35 0/0, en donnant naissance à de la cyclo-glycyl-glycine. Après la 5^e heure, alors que le départ de l'eau de dissolution paraît complet, la proportion du glyco-colle restée libre baisse brusquement, jusqu'à tomber en une demi-heure de 65 0/0 à 17 0/0 de la quantité primitive ; et au moment même où se produit la chute brusque du glyco-colle, se développe aussi brusquement la coloration brune du mélange.

A ce moment aussi, les deux courbes qui représentent l'azote total et le glyco-colle total (y compris celui qui se retrouve sous forme d'anhydrides) se séparent brusquement, révélant l'apparition d'un dérivé *azoté* du glyco-colle autre que les anhydrides. La matière brune doit donc être une substance azotée. Mais le fait que le glyco-colle initial peut baisser de 35 0/0 de sa valeur sans produire de la matière brune, et qu'au contraire celle-ci ne s'accroît qu'après la disparition presque complète du glyco-colle, montre que la matière brune n'est pas un dérivé de transformation directe du glyco-colle : il existe un intermédiaire. Enfin le fait que les produits (matière brune) autres que les anhydrides atteignent d'emblée 10 0/0 du glyco-colle initial, rapproché de l'abondance de la cyclo-glycyl-glycine par rapport à la triglycyl-glycine (peu abondante), donne à penser que cet intermédiaire doit être la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) elle-même.

La matière brune est une substance azotée dérivant de la cyclo-glycyl-glycine.

La matière brune ne se forme pas par oxydation. — Par quel genre de réaction la matière brune peut-elle dériver de la cyclo-glycyl-glycine ? La première idée qui se présente à l'esprit est celle d'une oxydation, la réaction se passant au contact de l'air. Cependant je me suis trouvé mis en défiance par ce fait que la coloration brune débute indistinctement et également dans toute l'épaisseur du mélange, et non par la surface, ce qui serait plus conforme à l'hypothèse de l'oxydation.

J'ai donc répété la réaction en soustrayant les produits à l'action de l'air, au moyen d'un courant d'azote ou d'hydrogène. L'expérience était réalisée dans de petits barboteurs spécialement construits, de forme haute et étroite, presque entièrement remplis par la solution aqueuse de glycolle et de glycérine, et placés dans l'étuve à 175°. Les tubes en verre soudés pour l'adduction et l'abduction du gaz avaient la longueur voulue pour sortir par l'ouverture supérieure de l'étuve ; le tube adducteur plongeait dans le liquide jusqu'à un niveau tel que son ouverture émergeât de la masse au moment où toute l'eau serait chassée, c'est-à-dire où le mélange aurait une consistance épaisse.

L'azote était produit par la décomposition à chaud d'un mélange équimoléculaire de nitrite de sodium et de chlorure d'ammonium en solution aqueuse, traversait des laveurs à potasse, et s'emmagasinait dans un gazomètre. Pour l'expérience il était conduit à travers deux laveurs garnis de pyrogallol en solution potassique, puis dans un laveur à acide sulfurique, ensuite dans un long tube garni de cuivre réduit (toile de cuivre) chauffé au rouge, enfin dans un grand tube en U rempli de potasse en fragments, d'où il accédait au vase à réaction.

L'hydrogène était produit par la réaction du zinc pur sur l'acide sulfurique pur étendu, en présence d'une trace de sulfate de cuivre ; le gaz traversait un laveur à potasse, et s'emmagasinait dans un gazomètre. Pour l'expérience, il traversait un laveur à acide sulfurique, un long tube garni de cuivre réduit (toile de cuivre) chauffé au rouge, enfin un grand tube en U garni de potasse en fragments, d'où il accédait au vase à réaction.

Après que le gaz (azote ou hydrogène) a passé bulle à bulle dans le mélange aqueux pendant une demi-heure, on commence à chauffer progressivement l'étuve, qui atteint 175° au bout d'une heure environ. L'eau de dissolution se vaporise alors, et en s'échappant achève de purger l'atmosphère du vase des dernières traces d'air, en admettant que le courant gazeux ne les ait pas entièrement balayées. Malgré cela, dès que l'eau est complètement éliminée, *le mélange glyciné brunit rapidement, en présence de l'azote ou de l'hydrogène, exactement comme en présence de l'air*. Il est impossible, même à un œil exercé, de remarquer aucune différence d'allure entre les trois réactions.

La formation de la matière brune azotée, aux dépens de la cyclo-glycyl-glycine, ne résulte donc pas d'un phénomène d'oxydation.

Le phénomène qui, après l'oxydation, semble le plus plausible, est celui de la déshydratation. Une réaction de ce genre devrait conduire à une substance cyclique très riche en carbone et en azote :



Mais je n'entends émettre, pour l'instant, aucune affirmation sur la constitution du corps brun, dont je me réserve de poursuivre l'étude.

Réactions d'alcaloïde dans les solutions brunes. — On verra dans la suite du présent travail que le chauffage à 170°, au sein de la glycérine, des aminoacides tels que l'alanine, la valine, la leucine, détermine la production, à côté des cyclo-glycyl-glycines correspondantes et des amines simples (éthylamine, isoamylamine, etc...), d'une petite quantité de bases plus complexes, offrant les réactions de précipitation des alcaloïdes cycliques, et qui sont peut-être des bases pyraziques ou hydropyraziques nées à partir des cyclo-glycyl-glycines (dikétopipérazines) par un processus de déshydratation.

Après avoir fait cette constatation dans le cas des aminoacides homologues du glycocole, j'ai pensé qu'on en ferait sans doute une semblable dans le cas du glycocole lui-même, et cela d'autant mieux que pendant le chauffage du glycocole au sein de la glycérine on observe le dégagement, non seulement d'un peu d'ammoniaque, mais aussi de vapeurs à odeur pyridoïde très nette et assez intense.

J'ai étudié d'abord 5 ou 6 échantillons de glycérines résiduelles dont on avait extrait, par précipitation alcoolique et cristallisation, la cyclo-polyglycyl-glycine, la triglycyl-glycine, et la cyclo glycyl-glycine, et dont l'alcool avait ensuite été chassé par distillation. Ces glycérines résiduelles étaient de coloration jaune-orangé, généralement peu intense, avec fluorescence verte. Malgré les pertes par volatilité qui avaient pu se produire au cours des manipulations et notamment lors de la distillation de l'alcool, ces glycérines montraient encore une réaction légèrement alcaline au tournesol. Mis en solution dans plusieurs fois leur volume d'eau, puis traités par les réactifs des alcaloïdes, ces résidus ne donnaient pas de précipitation nette avec l'acide picrique, le réactif de Bouchardat (iode en solution dans KI), et celui de Tanret (iodomercurate de potassium). Mais ils montraient en général des traces bien reconnaissables avec les réactifs de Brücke et de Valser (iodomercurate de potassium), et l'iodure de cadmium et de potassium ; ils fournissaient une précipitation notable avec le réactif de Dragen-

dorff (iodobismuthate de potassium), abondante avec l'acide phosphotungstique et l'acide silicotungstique. Ces deux derniers précipitants dépouillaient le liquide de sa matière orangée, sans que je veuille affirmer encore d'une façon définitive qu'il y ait identité complète (et non simple superposition) entre la matière colorante et la matière à caractère alcaloïdique.

D'autre part, j'ai étudié des échantillons débarrassés de glycérine et remis en solution aqueuse, de coloration brune aussi foncée que celle d'une infusion de café. Certains de ces échantillons étaient même si riches en matière brune que l'eau était impuissante à la dissoudre en totalité, et en laissait un excès en suspension : l'addition de quelques gouttes d'un acide minéral dissolvait instantanément cet excès et fournissait un liquide limpide. Or ces solutions brunes ne précipitaient ni par l'acide picrique, ni par l'iode en solution iodurée, ni par l'iodure de cadmium et de potassium, ni par l'iodomercurate de potassium (sauf peut-être le réactif de Brücke, peu abondamment d'ailleurs). En revanche elles donnaient un précipité très important par le réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium), énorme par les acides phosphotungstique et silicoduodécitungstique. Le silicotungstate précipité forme une masse épaisse de couleur chocolat, tandis que le liquide surnageant est presque totalement décoloré. La matière brune précipite donc massivement par l'acide silicotungstique, comme le ferait un alcaloïde, et il semble bien que le caractère basique et la coloration appartiennent à une seule et même substance ; je me réserve d'approfondir ultérieurement l'étude de cette question.

CHAPITRE VIII

MARCHE DE LA RÉACTION PEPTIDOGENE

Disposition de l'expérience. — On choisit 25 petits tubes cylindriques à fond plat, aussi semblables que possible, de même diamètre intérieur 28 millimètres, et de hauteur égale 60 millimètres.

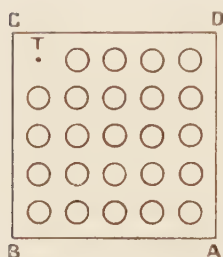
Chacun des 25 tubes reçoit d'abord 10 gr. 00 de glycérine pure commerciale à 30° B., pesés au demi-centigramme près, sauf l'un d'eux (tube n° 0) qui ne reçoit que 5 gr. 00 de glycérine. Puis on pèse 50 gr. 00 de glycocolle pur, pulvérisé et séché d'abord à 110° puis dans le vide sulfurique ; on introduit ce glycocolle dans un ballon jaugé de 250 cc., on effectue la dissolution par de l'eau chaude remplissant presque la capacité du ballon, et on réalise l'affleurement aussitôt que la température s'est équilibrée avec celle du laboratoire (18° environ). Avec une pipette, on introduit alors, aussi rapidement que possible, 10 cc. de solution, soit 2 gr. 00 de glycorolle, dans chacun des 24 tubes. Il reste suffisamment de solution pour en puiser facilement 5 cc. et les verser dans le tube n° 0. Il faut se hâter de faire cette répartition, car le glycocolle, qui se trouve en solution sursaturée, commencerait bientôt à cristalliser, ce qui fausserait les prises d'essai.

Avec une fine baguette de verre, on agite le contenu de chacun des tubes jusqu'à mélange homogène, on retire la baguette, et on fait couler lentement le long de ses parois 1 cc. d'eau distillée qui vient tomber à la surface du liquide. Dans ces conditions on peut abandonner les tubes jusqu'au lendemain sans crainte de cristallisation.

Le tube n° 0 est mis de côté comme témoin pour servir à contrôler le dosage du glycocolle par la méthode au formol. Les 24 autres sont installés côte à côte sur la tablette d'une étuve à air, dont le thermomètre T occupe l'un des angles, suivant la figure ci-contre.

L'étuve étant allumée le matin à 6 h. 55, on règle à la main le robinet du gaz de telle façon que la température s'élève progressivement sans

trop de précipitation, afin de permettre au contenu des tubes de s'équilibrer approximativement à la température indiquée par le thermomètre. A 7 h. 31 (37 minutes), le thermomètre



passé à 123° ; à ce moment on commence à voir quelques stries de vapeur à la surface des tubes : on retire le tube n° 1 et on referme rapidement l'étuve. A 7 h. 37 (1 heure 2 minutes), le thermomètre passe à 150° ; on retire rapidement le tube n° 2, et on baisse le gaz pour ralentir l'élévation de la température.

A 8 h. 45 (1 heure 50 minutes), le thermomètre atteint 175° , et des bulles gazeuses commencent à se former au sein du liquide, pour venir crever à la surface. On retire rapidement le tube n° 3, et on règle le feu en manœuvrant à la main le robinet de gaz, pour maintenir autant que possible la température constante à 175° . Pendant toute la journée, le thermomètre s'est maintenu très sensiblement vers 175° , n'oscillant guère qu'entre 173° et 177° . Une ou deux fois seulement, par suite de variations dans la pression du gaz, le thermomètre a atteint 170° ou 180° , mais pendant un temps assez court pour ne pas influencer sensiblement la température des masses sirupeuses en réaction.

A partir de 8 h. 45, la température étant maintenue à 175° , on retirait un tube de demi-heure en demi-heure, c'est-à-dire à 9 h. 15 (tube 4), 9 h. 45 (tube 5), 10 h. 15 (tube 6), et ainsi de suite jusqu'à 7 h. 15 du soir, après 10 h. $1/2$ de séjour à 175° (tube 24).

Pendant l'échauffement de l'étuve jusqu'à 175° (1 heure 50 minutes), on n'a observé à peu près aucun changement, sauf quelques stries réfringentes de l'atmosphère en contact avec les tubes, indiquant déjà une volatilisation de l'eau. C'est seulement vers le moment où l'étuve parvient à 175° , qu'on voit les bulles de vapeur se former au sein du liquide et crever à la surface : dès lors le niveau dans les tubes commence à baisser sensiblement.

Après 1 h. $1/2$ -2 heures à 175° , on commence à voir les tubes prendre une légère teinte blonde, qui s'accroît lentement et progressivement jusqu'à la fin de la 5^e heure. A ce moment, qui paraît coïncider avec la fin de la baisse de niveau dans les tubes, c'est-à-dire avec la fin de la volatilisation de l'eau, les tubes prennent en quelques minutes une teinte brun foncé, qui va en s'accroissant pendant une heure ou deux, le contenu de tous les tubes formant alors, après refroidissement, une pâte épaisse d'un brun foncé presque noir, avec un peu de fluorescence verdâtre.

En même temps que le produit se met à brunir intensément, il commence à dégager des vapeurs odorantes (diacipipérazine) qui se condensent dans l'atmosphère du laboratoire en un brouillard blanc, et se déposent en enduit blanc sur les vitres et divers objets.

Il convient d'observer que la température n'est pas rigoureusement uniforme dans toute l'étuve ; car, à l'époque où le contenu des tubes commence à brunir, il est facile de remarquer que les tubes voisins du thermomètre dans la région de l'angle C progressent un peu plus vite que les autres, dont la marche s'échelonne à peu près régulièrement de la région C à la région A. Cette inégalité provient évidemment d'une inégale perte de chaleur par les quatre parois latérales de l'étuve. L'étuve étant installée sur une paillasse dans un angle du laboratoire, la paroi BC est voisine d'une cloison de briques, la paroi CD est adossée à la garniture métallique d'une fenêtre, la paroi DA est à l'air libre, elle est en porcelaine et fonte comme les précédentes, tandis que la paroi AB, à l'air libre également, n'est formée que par la vitre de l'étuve. On conçoit donc que le refroidissement extérieur soit plus grand dans la région A que dans la région C.

Pour remédier à cet inconvénient, on a pris soin, au cours de l'expérience, de retirer successivement les tubes en commençant par la région A et progressant régulièrement vers la région C. De cette façon, l'ordre de succession des phénomènes est entièrement respecté, et l'allure générale des courbes que nous allons étudier plus loin n'est pas troublée. Tout au plus, faudrait-il apporter une légère correction numérique dans les paramètres de ces courbes, si l'on voulait les calculer mathématiquement, ce qui n'est pas notre but.

A mesure que les tubes sortis de l'étuve étaient suffisamment refroidis, leur contenu était dissous dans l'eau chaude et transporté, avec les lavages, dans un ballon jaugé de 100 cc., qu'on refroidissait rapidement dans l'eau, et dont on complétait le volume à 100 cc. dès qu'il avait repris la température du laboratoire. Pour les premiers tubes, cette dissolution était parfaitement limpide ; pour les tubes 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, elle renfermait en suspension quelques fines granulations noires dont nous examinerons plus loin la nature, et en quantité d'ailleurs insignifiante.

La série des échantillons 1 à 24, ainsi portés à 100 cc. de solution, a servi à faire un certain nombre de titrages et d'évaluations comparatives. On y a joint, comme point de repère, les résultats fournis par le tube témoin n° 0, après que son contenu eût été porté à 50 cc. de solution. Sur chaque échantillon ont été dosés : le glycocolle resté intact, puis le glycocolle retrouvé après hydrolyse des anhydrides qui avaient

pu se former, enfin l'azote total encore contenu dans l'échantillon, ce qui donne la perte par volatilisation dans les dernières heures, perte traduite aussi en glycocole. De plus, des évaluations comparatives ont permis, sinon de mesurer en valeur absolue, du moins de suivre approximativement la formation de la matière colorante brune, ainsi que celle du corps biurétique (triglycyl-glycine) que l'on trouve à la phase moyenne de l'expérience

Évaluation approximative de la matière colorante. — La solution des nos 0, 1, 2, 3, 4, 5, est absolument incolore. Les nos 7 et 8 présentent un très léger ton jaunâtre, et les nos 6 et 9 un ton du même genre, un peu plus accentué, et dont on peut évaluer l'intensité à environ 2 fois celle des échantillons nos 7 et 8. Si l'on prend ces très faibles colorations comme point de départ, on peut attribuer aux nos 7 et 8 la valeur 1, et aux échantillons 6 et 9, la valeur 2.

Les comparaisons suivantes ont été faites au colorimètre Duboscq, après que l'égalité d'éclairement des deux plages de ce colorimètre eut été contrôlée en intervertissant la place de ses cuves garnies de liquides colorés. On trouve ainsi que pour égaler la teinte d'une colonne de l'échantillon n° 10 épaisse de 25,0 millimètres, il faut environ 73 millimètres de la solution n° 9. Le n° 10 est donc environ 3 fois plus coloré que le n° 9, et on lui attribue la valeur 6.

Les échantillons nos 10, 11, 12, 13, forment un groupe de teintes très comparables, sauf l'intensité, et dont la plus intense rappelle celle de l'urine humaine normale. Le colorimètre a fourni dans ce groupe l'égalité de teinte pour les épaisseurs suivantes :

N° 10 : 45 mm. N° 11 : 24 mm. N° 12 : 17 mm. N° 13 : 15 mm.

D'où l'on calcule, en prenant pour le n° 10 la valeur 6, les valeurs 11,25 pour le n° 11, 16 pour le n° 12, 18 pour le n° 13.

A partir d'ici, il se produit une variation brusque et intense dans la coloration, qui devient brune et si foncée que les liquides, placés dans des flacons de 150 cc., paraissent presque complètement opaques.

La comparaison colorimétrique entre cette série et la série précédente devient très aléatoire, à cause du changement de la teinte, qui passe du jaune orangé au brun café. Néanmoins, en essayant d'apprécier l'équivalence des teintes, on arrive à déterminer la correspondance des épaisseurs suivantes :

Solution n° 13		Solution n° 14
50,0 mm.	correspondent à	2,8 mm.
85,0 mm.	»	4,5 mm.

La première détermination donne pour l'intensité de coloration du n° 14 la valeur $18 \times \frac{50,0}{2,8} = 320$; la seconde détermination donne $18 \times \frac{85,0}{4,5} = 340$. On attribue à la teinte n° 14 l'intensité 330, moyenne des deux déterminations. De la même façon, on trouve que 2,1 mm. de la solution n° 15 équivalent à peu près à 85,0 mm. de la solution n° 13, ce qui donne pour le n° 15 une intensité de 730 approximativement.

La solution n° 15 est alors prise comme étalon pour l'évaluation des suivantes, opération qui est relativement aisée, car les nuances sont alors très comparables. On trouve les équivalences suivantes :

10,0 mm. de solution n° 15	équivalent à	2,8 mm. de solution n° 16
10,0 » » n° 15	»	2,8 » » n° 17
10,0 » » n° 15	»	4,2 » » n° 18
10,0 » » n° 15	»	5,0 » » n° 19
10,0 » » n° 15	»	2,4 » » n° 20

De ces lectures on déduit les valeurs suivantes :

$$\text{N}^{\circ} 16 = 730 \times \frac{10,0}{2,8} = 2607$$

$$\text{N}^{\circ} 17 = 730 \times \frac{10,0}{2,8} = 2607$$

$$\text{N}^{\circ} 18 = 730 \times \frac{10,0}{4,2} = 1738$$

$$\text{N}^{\circ} 19 = 730 \times \frac{10,0}{5,0} = 1460$$

$$\text{N}^{\circ} 20 = 730 \times \frac{10,0}{2,4} = 3042$$

Il est en apparence singulier de constater que les solutions n° 18 et n° 19 contiennent moins de matière brune que les solutions n° 16 et n° 17, où la réaction a été moins prolongée. Mais il faut remarquer que dans les solutions 18 et 19 (et même un peu déjà dans la solution 17) se trouvent en suspension quelques fines parcelles solides contenant de la matière colorante fixée sur les granulations de l'anhydride polyglycylique insoluble. Les solutions ont donc perdu par précipitation une partie de leur matière brune, bien que l'œil n'y remarque aucune différence appréciable en couche épaisse, tellement le liquide est foncé. Aussi l'évaluation colorimétrique des solutions 17, 18, 19, même approximative, est-elle illusoire.

Pour une raison ignorée, la solution 20 ne présente guère de granulations indissoutes, aussi le chiffre colorimétrique est-il encore plus élevé. Mais dans les liquides 21, 22, 23, 24, une partie de la matière

brune s'est précipitée, et l'évaluation colorimétrique n'a pas été tentée.

Les chiffres représentant le développement progressif de la matière colorante peuvent être réunis dans le tableau suivant :

Evaluation approximative de la matière colorante :

Numéro de l'essai	Durée du chauffage	Intensité relative de la coloration
N ^o 0.	Témoin non chauffé	—
N ^o 1.	Passage à 125°	
N ^o 2.	Passage à 150°	
N ^o 3.	Arrivée à 175°	
N ^o 4.	1/2 heure à 175°	
N ^o 5.	1 heure à 175°	
N ^o 6.	1 h. 1/2 "	2
N ^o 7.	2 h. "	1
N ^o 8.	2 h. 1/2 "	4
N ^o 9.	3 h. "	2
N ^o 10.	3 h. 1/2 "	6
N ^o 11.	4 h. "	11
N ^o 12.	4 h. 1/2 "	16
N ^o 13.	5 h. "	18
N ^o 14.	5 h. 1/2 "	330
N ^o 15.	6 h. "	730
N ^o 16.	6 h. 1/2 "	2600
N ^o 17.	7 h. "	(2600)
N ^o 18.	7 h. 1/2 "	(1740)
N ^o 19.	8 h. "	(1460)
N ^o 20.	8 h. 1/2 "	3040
N ^o 21.	9 h. "	X
N ^o 22.	9 h. 1/2 "	X
N ^o 23.	10 h. "	X
N ^o 24.	10 h. 1/2 "	X

Evaluation approximative de la substance biurétique (triglycyl-glycine). — En l'absence d'une méthode précise capable de fournir un véritable dosage de la triglycyl-glycine dans chacun des échantillons, il m'a semblé néanmoins très important d'être renseigné d'une manière approchée sur les variations quantitatives de cette substance, en prenant pour base d'une évaluation sommaire l'intensité de la réaction du biuret fournie par chacune des 25 solutions.

Mais cette intensité elle-même ne peut pas être déterminée au colorimètre, car on aurait à comparer des nuances toujours différentes. La triglycyl-glycine donne en effet une magnifique réaction rose-carmin, mais lorsqu'on verse un alcali et un sel cuivrique dans une solution de glyocolle, on obtient un liquide de couleur bleu céleste intense. Dans un mélange de triglycyl-glycine et de glyocolle, ce qui est le cas d'un certain nombre des 25 échantillons, c'est la réaction rose de la triglycyl-glycine qui se montre d'abord, dès les premières traces de cuivre, mais la réaction bleue du glyocolle vient s'y superposer lorsqu'on continue à verser du cuivre. Si même on ajoute un excès de cuivre dans une solution de triglycyl-glycine exempte de glyocolle, on a néanmoins une teinte violette, due en partie à de fines parcelles d'hydrate cuivrique bleu qui reste longtemps en suspension ou pseudo-solution.

On ne peut donc traiter la série des échantillons par une quantité constante de cuivre, prise en excès, puis comparer au colorimètre l'intensité des teintes : on aurait, non pas une même teinte rose d'intensité variable, mais bien une gamme de nuances différentes allant du violet-rose au bleu-violet, ne se prêtant pas à une comparaison d'épaisseurs au colorimètre Duboscq.

Cependant on peut baser une évaluation approximative sur ce fait que dans un mélange de triglycyl-glycine et de glyocolle, c'est d'abord la triglycyl-glycine seule qui fixe le cuivre en donnant une coloration rose pur, tandis que le glyocolle n'intervient qu'ensuite pour donner à l'ensemble un ton violet virant de plus en plus vers le bleu. Il est donc évident qu'une solution mixte de ce genre sera d'autant plus riche en triglycyl-glycine qu'elle pourra supporter une quantité plus grande de cuivre tout en conservant la teinte rose pur, et sans commencer de virer au violet.

J'ai donc prélevé, de chacune des 25 solutions, 5 cc. qui ont été placés dans un petit tube à essai (tous ces tubes étant semblables de forme et de calibre) ; puis chaque prise d'essai a reçu 2 cc. de soude à 32° B., et enfin un nombre variable de gouttes d'une même solution de sulfate de cuivre versée avec le même compte-gouttes (la solution était à 35 gr. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ par litre, et le compte-gouttes donnait 42,4 gouttes par centimètre cube). En agitant le tube à essai après chaque addition de cuivre, on peut déterminer assez facilement le moment où le liquide commence à virer au violet : si on ne peut prétendre que le nombre de gouttes de solution cuivrique qu'il a fallu verser pour arriver à ce point soit exactement proportionnel à la quantité de triglycyl-glycine, il est néanmoins évident qu'il varie dans le même sens.

En essayant ainsi les 25 échantillons successifs, on constate que les premiers donnent, dès la première goutte de solution cuivrique, la teinte bleue du glyocolle pur, sans aucun ton violet : ils ne contiennent pas trace de corps biurétique. Pour l'échantillon n° 6, on peut se demander si la coloration produite par la première goutte de solution cuivrique est bien d'un bleu exactement semblable aux colorations précédentes, mais il ne s'agit encore que d'un soupçon assez vague. Le premier échantillon qui contienne avec certitude des traces de corps biurétique est le n° 9 : la première goutte de solution cuivrique produit une coloration presque bleue, mais qui par rapport aux précédentes montre cependant un virage reconnaissable, quoique très léger, vers le violet : le n° 9 renferme certainement des traces de triglycyl-glycine.

Les n°s 10, 11, 12, 13, donnent une belle réaction biurétique, d'intensité croissante, dont la teinte reste d'un rose bien pur tant qu'on n'y verse pas plus de 3, 6, 10, 15 gouttes, respectivement, de solution cuivrique ; au delà, l'addition prolongée du cuivre fait passer la teinte au violet.

Avec le n° 14, on aborde les solutions dont la coloration naturelle, d'un brun noir foncé, rend illusoire toute espèce de réaction colorée. Néanmoins j'ai pu continuer assez aisément l'évaluation approchée de la substance biurétique, grâce au noir animal. Dans un tube à essai on prend une forte pincée de noir, puis 10 cc. environ de la solution à étudier ; on agite bien, on chauffe progressivement jusqu'au voisinage de l'ébullition, et on répète encore deux fois ce chauffage rapide, à 5 minutes d'intervalle ; le liquide est alors filtré, et se trouve débarrassé de la matière brune : il ne présente plus qu'une teinte jaune analogue à celle de l'urine, mais avec forte fluorescence verdâtre. On peut alors y suivre assez facilement l'allure des colorations produites par le sel cuivrique en présence de soude. Je n'entends pas dire que le noir n'aurait pas retenu la plus minime fraction de la substance biurétique, je l'ignore ; mais on peut se convaincre, en comparant les chiffres, que dans le cas où une certaine fraction de triglycyl-glycine aurait disparu, elle ne pourrait être que petite et sans influence sur les évaluations actuelles.

La teneur en triglycyl-glycine et l'intensité de la réaction du biuret augmente maintenant d'une façon telle, que pour apprécier commodément la montée et le virage de la teinte, il est utile de procéder par additions de 5 gouttes à la fois de la solution cuivrique. C'est ainsi que le maximum de la teinte rose, avant virage au violet, est obtenu pour les échantillons n°s 14, 15, 16, 17, avec 25, 45, 55, 60 gouttes de cuivre. Puis la teneur en substance biurétique décroît très brusquement,

et les nos 18, 19, 20, 21, ne comportent plus respectivement que 24, 16, 13, 6 gouttes.

Pour les derniers échantillons, la teinte jaune-brunâtre, avec forte fluorescence verte, qui persiste après l'action du noir, est un peu plus intense et ne facilite pas l'appréciation des teintes. Néanmoins on a pu évaluer à 4 et à 2 le nombre des gouttes de solution cuivrique que comportent respectivement les échantillons 22 et 23. Quant au n° 24, il ne présente plus que des traces, assez difficilement reconnaissables, de réaction biurétique.

On peut résumer les évaluations approximatives de la substance biurétique (triglycyl-glycine), dans le tableau suivant :

Évaluation approximative de la substance biurétique :

Numéro de l'essai	Durée du chauffage	Intensité relative de la coloration
N° 0. . . .	Témoin non chauffé	
N° 1. . . .	Passage à 125°	
N° 2. . . .	Passage à 150°	
N° 3. . . .	Arrivée à 175°	
N° 4. . . .	1/2 heure à 175°	
N° 5. . . .	1 heure »	
N° 6. . . .	1 h. 1/2 »	?
N° 7. . . .	2 h. »	
N° 8. . . .	2 h. 1/2 »	
N° 9. . . .	3 h. »	traces
N° 10	3 h. 1/2 »	3
N° 11	4 h. »	6
N° 12	4 h. 1/2 »	10
N° 13	5 h. »	15
N° 14	5 h. 1/2 »	25
N° 15	6 h. »	45
N° 16	6 h. 1/2 »	55
N° 17	7 h. »	60
N° 18	7 h. 1/2 »	24
N° 19	8 h. »	16
N° 20	8 h. 1/2 »	13
N° 21	9 h. »	6
N° 22	9 h. 1/2 »	4
N° 23	10 h. »	2
N° 24	10 h. 1/2 »	traces

Dosage du glycocolle libre. Le dosage du glycocolle resté à l'état libre dans chacun des 25 échantillons, doit être considéré, non plus comme une simple estimation approchée et comparative, mais bien comme un véritable dosage en valeur absolue et suffisamment précis. Il a été fait par la méthode au formol, dont on connaît le principe.

On sait que l'ammoniaque, les amines, les acides aminés, se combinent à l'aldéhyde formique pour donner des dérivés méthyléniques. Ceux qui correspondent aux aminoacides ont été étudiés particulièrement par H. SCHIFF (1) ; leur formation répond à la réaction :



Alors que les acides aminés eux-mêmes ne présentent vis-à-vis des indicateurs (phénolphtaléine) qu'une réaction presque neutre ou à peine acide, le blocage de la fonction amine par le groupe méthylénique emprunté au formol a pour effet de mettre en évidence la fonction acide. Moyennant certaines précautions, celle-ci peut être titrée par la soude ou la baryte en présence de phénolphtaléine, avec des résultats souvent satisfaisants.

C'est du moins ce qui résulte des recherches entreprises par S. P. L. SÖRENSEN (2) pour élever le blocage formolique à la hauteur d'une méthode de titrage pour les acides aminés, à peu près en même temps que A. D. RONCHÈSE (3) l'utilisait pour le titrage des sels ammoniacaux dont l'acide est mis en évidence par une réaction du même genre.

Cependant le titrage des acides aminés par la méthode au formol présente de réelles difficultés, comme l'a fort bien établi S. P. L. SÖRENSEN lui-même. Outre que certains représentants du groupe perturbent très fortement le titrage, par suite de leur constitution spéciale, comme la proline qui ne marque que pour une faible fraction de sa valeur, ou la tyrosine qui au contraire marque davantage et jusqu'à deux fois plus (à cause de sa fonction phénol), les aminoacides même les plus simples ne fournissent que grâce à des précautions particulières des chiffres à

1. H. SCHIFF. Ueber Methylenasparagine (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 310, 25, 1899). — Trennung von Amin- und Säurefunktion in Lösungen von Aminosäuren mittelst Formaldehyd (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 319, 39, 1901).

2. S. P. L. SÖRENSEN. Enzymstudien (*Biochem. Zeitschr.*, 7, 45, 1907).

3. A. D. RONCHÈSE. Nouveau procédé de dosage de l'ammoniaque (*C. R. Soc. Biolog.*, 62, 779 et 867, 1907 ; *Journ. de Pharm. et Chim.*, 6^e s., 25, 611, 1907 ; *Bull. Soc. chim.*, 4^e s., 1, 900, 1907).

peu près acceptables. Par exemple, on arrive à obtenir pour l'histidine 89 0/0 du chiffre théorique, pour la lysine 92,5 0/0, pour la leucine 97 0/0, pour l'alanine 98 0/0, pour le glyocolle 98,5 0/0, pour l'acide glutamique 99,5 0/0. Mais si dans les titrages on prend comme point de virage de la phénolphtaléine la teinte rose légère à laquelle on s'arrête ordinairement dans les manipulations volumétriques, on n'obtient même pas des chiffres de cet ordre, auxquels on ne peut parvenir qu'en poussant le virage jusqu'à des teintes d'un rouge intense que l'œil a de la difficulté à apprécier, à moins de prendre des étalons de comparaison. Encore faut-il respecter certaines conditions de concentration, de proportions, de volume total, etc., pour lesquelles on ne peut que renvoyer au mémoire original de S. P. L. SÖRENSEN.

Bref, je crois pouvoir dire, en me basant tant sur les travaux de SÖRENSEN que sur mes essais personnels, que pour chacun des cas d'application de la méthode au formol, il est nécessaire de régler soi-même et à chaque fois les détails de la technique, à l'aide de contrôles méthodiques sur des liquides de composition connue. On ne s'étonnera donc pas de voir ici deux séries de mesures tout à fait parallèles comporter deux techniques de titrage différentes, parce que l'une s'adressait au glyocolle libre, et l'autre au chlorhydrate de glyocolle.

Voici exactement la technique suivie *pour le glyocolle libre*. Dans un vase à précipiter, on place 10 cc. de la solution à étudier, avec 2 gouttes de phénolphtaléine en solution alcoolique à 2 0/0, puis à l'aide d'une burette on verse de la soude quart-normale, dont on arrête l'addition dès que le liquide a pris la plus légère teinte rose appréciable. On ajoute alors, d'un seul coup, 50 cc. d'une solution préparée en étendant de son volume d'eau le formol à 40 0/0 du commerce et neutralisant son acidité naturelle par de la soude versée goutte à goutte jusqu'à rosissement naissant de la phénolphtaléine ajoutée à ce formol. L'addition du formol décolore instantanément le liquide rosé : sans plus attendre, on continue à verser la soude quart-normale jusqu'à réapparition de la plus légère teinte rose. Cette seconde addition de soude neutralise l'acidité du glyocolle révélée après blocage de la fonction aminée par le formol : c'est donc elle qui mesure la teneur du liquide en glyocolle.

Au point de départ de l'expérience, chaque échantillon contient 2 gr. 00 de glyocolle, qui se trouvent ensuite dissous dans un volume de 100 cc. : 10 cc. de cette solution contiennent donc 0 gr. 2000 de glyocolle, soit $\frac{0,2000}{75} = 0,002666...$ molécule. Ces 10 cc. doivent, après l'action du formol, neutraliser 0,002666... molécule NaOH, soit

10 cc. 66... de soude quart-normale. Or, deux titrages effectués sur le témoin non chauffé n° 0, ont donné les chiffres suivants :

Numéro de l'essai	Acidité préexistante (en soude N/4)	Acidité révélée par le formol (en soude N/4)
N° 0	0 cc. 2	10 cc. 3
N° 0	0 cc. 2	10 cc. 3

On voit que, avant toute réaction, et en présence de 5 fois le poids de glycérine, on trouve pour exprimer le glycocole le chiffre 10 cc. 3 au lieu du chiffre théorique 10 cc. 66... La concordance est très suffisante pour indiquer que la glycérine n'exerce pas de perturbation sensible sur le titrage, et que l'on aura de très bonnes mesures si l'on prend pour point de départ ce chiffre 10 cc. 3 représentant 100 0/0 de glycocole inaltéré.

Les premiers échantillons de la série, incolores ou à peine colorés, se titrent très aisément sur 10 cc., sans aucune complication :

Numéro de l'essai	Acidité préexistante (en soude N/4)	Acidité révélée par le formol (en soude N/4)
N° 0	0 cc. 2	10 cc. 3
N° 1	0 cc. 25	10 cc. 25
N° 2	0 cc. 2	10 cc. 3
N° 3	0 cc. 25	10 cc. 25
N° 4	0 cc. 2	10 cc. 3
N° 5	0 cc. 2	10 cc. 3
N° 6	0 cc. 25	10 cc. 0
N° 7	0 cc. 25	10 cc. 2
N° 8	0 cc. 25	10 cc. 05
N° 9	0 cc. 25	9 cc. 9

On voit que la précision du dosage est limitée à un demi-dixième de centimètre cube (voir nos 1 et 3), et sous cette réserve on constate facilement que dans le témoin et les 5 premiers essais, la totalité du glycocole est restée parfaitement intacte.

Les quatre échantillons suivants présentent avec intensité croissante, une teinte qui rappelle celle de l'urine humaine, et qui rend plus délicate à reconnaître l'apparition de la première trace de coloration rose lors du virage. Aussi les 10 cc. de la prise d'essai ont-ils été additionnés d'eau en quantité croissante, après que des contrôles sur quelques échantillons précédents eurent montré qu'on pouvait ajouter jusqu'à 40 ou 50 cc.

d'eau sans fausser notablement le titrage. De plus, chaque prise d'essai de 10 cc. était faite en double, l'une d'elles recevant seulement un volume d'eau égal à celui des réactifs ajoutés à l'autre, et servant ainsi de témoin pour l'appréciation du virage. Avec ces précautions, la détermination est très facile :

Numéro de l'essai	Acidité préexistante (en soude N/4)	Acidité révélée par le formol (en soude N/4)
N° 10 (+ 10 cc. eau) . .	0 cc. 35	8 cc. 5
N° 11 (+ 10 cc. eau) . .	0 cc. 35	7 cc. 75
N° 12 (+ 20 cc. eau) . .	0 cc. 35	7 cc. 1
N° 13 (+ 30 cc. eau) . .	0 cc. 4	6 cc. 7

L'essai n° 14, même après addition de 50 cc. d'eau, est encore beaucoup trop coloré (en brun) pour qu'on puisse songer à un titrage. Il a fallu recourir à la décoloration par le noir animal. Dans un tube à essai on prend une forte pincée de noir, puis 16-18 cc. de la solution à étudier, on agite bien, et on porte au voisinage de l'ébullition le tube sur lequel a été posé un bouchon pour s'opposer autant que possible à la perte d'eau. On répète ce rapide chauffage encore deux fois à 5 minutes d'intervalle, puis on filtre et on prélève pour le titrage 10 cc. du filtrat refroidi.

Des prises des échantillons n°s 12 et 13, ainsi traitées pour contrôle, sont devenues incolores comme de l'eau. Titrées avec les mêmes additions d'eau que précédemment (20 cc. et 30 cc.), elles ont fourni pour le glycolle les chiffres 7 cc. 0 et 6 cc. 6, au lieu de 7 cc. 1 et 6 cc. 7, soit un écart de 0 cc. 1 seulement. Si donc le noir peut retenir des traces de glycolle, ce ne peut être que dans une mesure fort minime et sans influence sur l'allure de la courbe que nous déterminons.

Les échantillons 14, 15, 16, 17, 18, après passage au noir, présentent encore une teinte jaune analogue à celle des échantillons 12 et 13, avec forte fluorescence verte. Tous ont été additionnés de 30 cc. d'eau avant le titrage. Mais il est intéressant de remarquer que, grâce peut-être à la présence du corps fluorescent, la netteté du virage de la phthaléine se trouve singulièrement renforcée, ce qui rend l'emploi de témoins tout à fait superflu. C'est ainsi qu'on a pu déterminer avec précision les chiffres suivants :

Numéro de l'essai	Acidité préexistante (en soude N/4)	Acidité révélée par le formol (en soude N/4)
N ^o 14. . . .	0 cc. 4	1 cc. 75
N ^o 15. . . .	0 cc. 3	1 cc. 15
N ^o 16. . . .	0 cc. 1	0 cc. 1
N ^o 17. . . .	0 cc. 1	0 cc. 0
N ^o 18. . . .	0 cc. 1	0 cc. 0

La disparition du glyocolle étant totale après 7 heures de séjour à 175°, il était inutile de poursuivre le titrage sur les derniers échantillons.

Si l'on considère le volume de soude 10 cc. 3 comme correspondant à 100 0/0 de glyocolle inaltéré, il est facile de calculer la proportion de ce glyocolle demeurée intacte dans chacun des échantillons. Cette proportion est indiquée dans la dernière colonne du tableau suivant :

Dosage du glyocolle inaltéré :

Numéro de l'essai	Durée du chauffage	Glyocolle inaltéré (en soude N/4)	Glyocolle inaltéré (0/0 de la quantité primitive)
N ^o 0. . .	Témoin non chauffé	10 cc. 3	100 0/0
N ^o 1. . .	Passage à 125°	10 cc. 25	100
N ^o 2. . .	Passage à 150°	10 cc. 3	100
N ^o 3. . .	Arrivée à 175°	10 cc. 25	100
N ^o 4. . .	1/2 heure à 175°	10 cc. 3	100
N ^o 5. . .	1 heure »	10 cc. 3	100
N ^o 6. . .	1 h. 1/2 »	10 cc. 0	97
N ^o 7. . .	2 h. »	10 cc. 2	99
N ^o 8. . .	2 h. 1/2 »	10 cc. 05	97,5
N ^o 9. . .	3 h. »	9 cc. 9	96
N ^o 10. . .	3 h. 1/2 »	8 cc. 5	82,5
N ^o 11. . .	4 h. »	7 cc. 75	75
N ^o 12. . .	4 h. 1/2 »	7 cc. 1	69
N ^o 13. . .	5 h. »	6 cc. 7	65
N ^o 14. . .	5 h. 1/2 »	1 cc. 75	17
N ^o 15. . .	6 h. »	1 cc. 15	11
N ^o 16. . .	6 h. 1/2 »	0 cc. 1	1
N ^o 17. . .	7 h. »	0 cc. 0	0
N ^o 18. . .	7 h. 1/2 »	0 cc. 0	0
N ^o 19. . .	8 h. »		
N ^o 20. . .	8 h. 1/2 »		
N ^o 21. . .	9 h. »		
N ^o 22. . .	9 h. 1/2 »		
N ^o 23. . .	10 h. »		
N ^o 24. . .	10 h. 1/2 »		

Dans toute cette série on ne rencontre qu'une seule anomalie, très légère d'ailleurs, et que nous avons déjà observée dans la coloration du mélange réagissant et dans l'intensité de la réaction biurétique, pour le n° 6. Nous avons dit déjà que cette légère anomalie était due à une surchauffe locale dans l'étuve, surchauffe qui a fait progresser la réaction, dans le tube n° 6, un peu plus vite que de raison.

Dosage total du glyocolle libre et anhydrisé. — On vient de voir que, après 2 heures de séjour à 175° (tube n° 7), la teneur en glyocolle libre commence à baisser, par suite de la formation d'anhydrides, peut-être la glycyl-glycine, sûrement la 2.5.diacipipérazine, la triglycyl-glycine, et tardivement l'anhydride corné. Or tous ces anhydrides ont pour caractère commun de se transformer intégralement en glyocolle par l'hydrolyse acide, de telle sorte que, aussi longtemps qu'aucune fraction ne passera sous une forme autre que ces anhydrides, on pourra régénérer tout le glyocolle par l'hydrolyse acide, et le retrouver intégralement par une méthode quantitative appropriée. Au contraire, si une fraction quelconque du glyocolle a subi une altération plus avancée, par des réactions autres que la simple anhydrisation, on ne pourra plus en régénérer le glyocolle, et le dosage après hydrolyse présentera un déficit.

Le dosage du glyocolle total après régénération éventuelle par hydrolyse était donc un moyen très précieux pour révéler les réactions secondaires qui auraient pu se produire.

De chacune des solutions (contenu de chaque tube porté à 100 cc.) sont prélevés 10 cc., qui sont introduits, comme s'il s'agissait d'un dosage de Kjeldahl, dans un matras à long col (40 centimètres) obtenu partiellement par un entonnoir, avec 50 cc. d'acide chlorhydrique étendu renfermant environ 5 0/0 de HCl (150 cc. d'acide pur commercial étendus à 1 litre). Les matras sont chauffés sur les brûleurs spéciaux jusqu'à faible ébullition, qui est maintenue pendant 6 heures consécutives. Après refroidissement, le contenu de chaque matras est transvasé, avec les lavages, dans une capsule placée sur un bain-marie bouillant où on la maintient 1 heure après l'évaporation de l'eau ; on reprend le résidu pâteux par 30 cc. d'eau qu'on évapore de nouveau, et on répète encore une fois cette opération, afin de chasser aussi complètement que possible l'excès de HCl. Le dernier résidu pâteux contient, outre 1 gr. de glycérine, tout le glyocolle à l'état de chlorhydrate.

Mais le dosage de ce glyocolle en combinaison chlorhydrique, par la méthode au formol, ne peut se faire avec la même technique que celui

du glycocolle libre précédemment titré. Des essais préliminaires m'ont appris que si, au produit repris par l'eau, on veut ajouter de la soude quart-normale, jusqu'à très légère coloration rose de la phtaléine, il est impossible de savoir quand on doit s'arrêter, car la légère teinte rose d'abord obtenue disparaît presque instantanément, et il faut continuer longtemps les additions de soude avant d'obtenir un virage un peu durable. D'autre part, si à ce liquide tant bien que mal neutralisé, on ajoute comme précédemment 50 cc. de formol préparé, puis qu'on recommence aussitôt à verser de la soude, on arrive au nouveau virage rose bien avant d'avoir versé la quantité de soude qu'exigerait le glycocolle présent, et ce virage est lui-même assez fuyant. Si l'on veut prendre comme point de repère le léger virage au rose, on n'obtient, en présence de HCl combiné au glycocolle, que des résultats très inférieurs à la réalité et complètement inutilisables.

Après quelques tâtonnements, je me suis arrêté à une technique qui est lente, pénible par l'attention très soutenue qu'elle exige, et un peu moins précise que la technique suivie pour doser le glycocolle libre, mais qui néanmoins donne des résultats satisfaisants entre les mains d'un observateur un peu exercé, et permet de résoudre facilement le problème que je m'étais posé.

Après volatilisation de l'excès de HCl, le résidu sirupeux est dissous, dans la capsule même, par 10 cc. d'eau; on ajoute 4 gouttes de phénol-phtaléine en solution alcoolique à 20/0, et on verse NaOH quart-normale, non pas seulement jusqu'à léger virage rose, mais très longtemps après, jusqu'à une teinte d'un rouge très violent qui doit persister sans faiblir pendant 3 minutes: on fait alors la première lecture. Cette phase correspond à la fixation par NaOH de HCl du chlorhydrate, et à la libération du glycocolle. On verse alors 50 cc. de formol préparé comme à l'ordinaire (formol commercial dédoublé et neutralisé jusqu'à phtaléine rose): la décoloration du liquide est instantanée, mais la combinaison du formol au glycocolle est lente en l'absence d'un excès d'alcali. On verse donc d'un seul coup, aussitôt après le formol, 15 cc. de soude quart-normale, ce qui ramène la teinte rouge intense, et on abandonne pendant un quart d'heure. On verse alors 10 cc. de H_2SO_4 quart-normal, ce qui décolore le liquide, puis on ajoute progressivement de la soude, non pas seulement jusqu'à première teinte rose, mais jusqu'à ce que l'addition d'une nouvelle goutte de soude ne paraisse plus accentuer l'intensité de la teinte rouge. La nouvelle quantité de soude ainsi versée, augmentée de 5 cc., correspond évidemment à la fonction acide du glycocolle.

Les essais nos 0, 1, 2, 3, 4, où le glycocolle initial n'avait subi aucune altération, n'ont pas été examinés.

L'essai n° 5, où le glycolle avait été retrouvé intégralement à l'état de liberté, a été étudié comme témoin : après avoir subi la série complète des manipulations, il a donné les résultats suivants :

Numéro de l'essai	Soude N/4 consommée par HCl du chlorhydrate	Soude N/4 consommée par l'acidité du glycolle
N° 5 . . .	10 cc. 45	10 cc. 85

La technique adoptée fournit donc deux mesures du glycolle, l'une répondant à la quantité de HCl fixée sur la fonction basique de l'acide, l'autre à la fonction acide du glycolle lui-même, révélée par le formol. On voit que ces deux mesures s'écartent très peu, l'une par défaut, l'autre par excès, du chiffre théorique qui serait, nous l'avons dit, 10 cc. 66... Bien plus, si on prend la moyenne 10,65 des deux mesures, on tombe sur le chiffre théorique lui-même. Cependant la première détermination risquerait d'être influencée par un petit excès éventuel de HCl qui aurait pu n'être qu'incomplètement chassé : aussi choisirons-nous la seconde, en posant que 10 cc. 85 de soude N/4 correspondent ici à 100 0/0 de glycolle intact ou régénéré.

Les solutions nos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, sont incolores ou peu colorées ; d'ailleurs le chauffage avec HCl étendu fait disparaître complètement la coloration des dernières : ces titrages ne présentent donc aucune difficulté :

Numéro de l'essai	Soude N/4 consommée par HCl du chlorhydrate	Soude N/4 consommée par l'acidité du glycolle
N° 6 . . .	10 cc. 5	10 cc. 8
N° 7 . . .	10 cc. 35	10 cc. 85
N° 8 . . .	10 cc. 45	10 cc. 8
N° 9 . . .	10 cc. 45	10 cc. 85
N° 10 . . .	10 cc. 45	10 cc. 85
N° 11 . . .	10 cc. 45	10 cc. 85
N° 12 . . .	10 cc. 45	10 cc. 85
N° 13 . . .	10 cc. 5	10 cc. 85

On voit que l'hésitation ne dépasse pas 0 cc. 05 ; encore est-ce un maximum qu'on trouve dans les premiers dosages, alors que l'œil de l'observateur est moins exercé. On remarque de plus que jusqu'ici, on retrouve après l'hydrolyse la totalité du glycolle primitif, bien que la proportion du glycolle restée libre soit tombée à 65 0/0 dans le n° 13 : les 45 0/0 manquant du glycolle primitif ont donc été purement et simplement transformés en anhydrides hydrolysables, sans aucun autre genre de réaction.

A partir d'ici, on aborde les échantillons qui ont brusquement pris la teinte brun noir très intense. On a vu que pour les échantillons nos 14 et 15, il avait été tout à fait impossible de songer à exécuter directement le titrage au formol, à cause de leur coloration si foncée, et qu'il avait fallu recourir au noir animal. Or il est intéressant de noter que, lors de l'hydrolyse chlorhydrique, ces solutions se sont décolorées presque entièrement, à tel point que le titrage a pu se faire aisément sans recourir au noir :

Numéro de l'essai	Soude N/4 consommée par HCl du chlorhydrate	Soude N/4 consommée par l'acidité du glycocole
N° 14 . . .	9 cc. 95	10 cc. 0
N° 15 . . .	9 cc. 8	9 cc. 85

Mais les solutions suivantes, bien que leur coloration ait un peu baissé d'intensité au cours de l'hydrolyse chlorhydrique, sont cependant restées tellement foncées qu'il était impossible d'y chercher les virages de la phtaléine. Aussi ont-elles été décolorées au noir ; mais pour éviter d'avoir à épuiser à fond la masse du noir, opération toujours un peu aléatoire et certainement fastidieuse, la difficulté a été tournée par le procédé suivant. L'hydrolyse chlorhydrique a été répétée sur une deuxième prise de 10 cc., de manière à disposer au total du produit d'hydrolyse de 20 cc. ; le contenu et les lavages des deux matras étant réunis dans une même capsule, l'excès de HCl a été chassé comme à l'ordinaire. Puis le résidu, repris par l'eau et porté à 100 cc. exactement, a été placé dans une fiole d'Erlenmeyer, additionné de quelques pincées de noir, et chauffé jusqu'à ébullition commençante après bouchage presque complet de la fiole pour s'opposer à la perte d'eau. Après refroidissement on filtre, on prélève 50 cc. du filtrat, qu'on évapore dans une capsule à consistance pâteuse, ce qui fournit le produit d'hydrolyse de 10 cc. de solution. On fait sur le résidu le titrage comme à l'ordinaire :

Numéro de l'essai	Soude N/4 consommée par HCl du chlorhydrate	Soude N/4 consommée par l'acidité du glycocole
N° 16 . . .	8 cc. 8	8 cc. 7
N° 17 . . .	8 cc. 65	8 cc. 7
N° 18 . . .	9 cc. 2	9 cc. 25
N° 19 . . .	9 cc. 15	9 cc. 15
N° 20 . . .	8 cc. 0	7 cc. 8
N° 21 . . .	6 cc. 65	6 cc. 4
N° 22 . . .	7 cc. 15	7 cc. 05
N° 23 . . .	6 cc. 05	6 cc. 0
N° 24 . . .	6 cc. 0	5 cc. 95

Si l'on adopte les chiffres fournis par la deuxième partie du titrage (après action du formol), en constatant que la quantité initiale du glyco-
colle est représentée par 10 cc. 85 de soude quart-normale, il est
facile de calculer la proportion de glyco-
colle total subsistant dans cha-
cun des essais, tant à l'état libre qu'à l'état d'anhydrides capables de
régénérer hydrolytiquement le glyco-
colle. Ces teneurs en glyco-
colle sont résumées dans le tableau suivant :

*Dosage du glyco-
colle total (libre ou anhy-
dri-
sé) :*

Numéro de l'essai	Durée du chauffage	Glyco- colle total (en soude N/4)	Glyco- colle total (0/0 de la quantité primitive)
N ^o 0. . .	Témoin non chauffé		
N ^o 1. . .	Passage à 125°		
N ^o 2. . .	Passage à 150°		
N ^o 3. . .	Arrivée à 175°		
N ^o 4. . .	1/2 heure à 175°		
N ^o 5. . .	1 heure »	10 cc. 85	100 0/0
N ^o 6. . .	1 h. 1/2 »	10 cc. 8	100
N ^o 7. . .	2 h. »	10 cc. 85	100
N ^o 8. . .	2 h. 1/2 »	10 cc. 8	100
N ^o 9. . .	3 h. »	10 cc. 85	100
N ^o 10. . .	3 h. 1/2 »	10 cc. 85	100
N ^o 11. . .	4 h. »	10 cc. 85	100
N ^o 12. . .	4 h. 1/2 »	10 cc. 85	100
N ^o 13. . .	5 h. »	10 cc. 85	100
N ^o 14. . .	5 h. 1/2 »	10 cc. 0	92
N ^o 15. . .	6 h. »	9 cc. 85	91
N ^o 16. . .	6 h. 1/2 »	8 cc. 7	80
N ^o 17. . .	7 h. »	8 cc. 7	80
N ^o 18. . .	7 h. 1/2 »	9 cc. 25	85
N ^o 19. . .	8 h. »	9 cc. 15	84
N ^o 20. . .	8 h. 1/2 »	7 cc. 8	72
N ^o 21. . .	9 h. »	6 cc. 4	59
N ^o 22. . .	9 h. 1/2 »	7 cc. 05	65
N ^o 23. . .	10 h. »	6 cc. 0	55
N ^o 24. . .	10 h. 1/2 »	5 cc. 95	55

On voit que pendant plusieurs heures le chiffre du glyco-
colle total, après régénération par hydrolyse des anhydrides, se maintient à 100 0/0.
Ensuite il baisse, mais avec certaines irrégularités dans les chiffres. On
pourrait croire que ces irrégularités proviendraient de défauts d'exacti-

tude dans la technique du dosage : or il n'en est rien, car nous allons retrouver dans le dosage de l'azote total des irrégularités tout à fait parallèles, qui ne peuvent dériver d'erreurs fortuites dans la technique, et dont nous rechercherons alors les causes.

Dosage de l'azote total. — Depuis le moment où la teneur en glycolle libre commence à baisser (après 1 h. 1/2 de séjour à 175°), jusqu'au moment où le mélange commence à se colorer fortement et la baisse du glycolle libre à devenir très rapide (après 5 heures de séjour à 175°), la totalité du glycolle disparu peut être retrouvée par l'hydrolyse des anhydrides. Bien que cette fraction disparue du glycolle atteigne déjà 35 0/0 de la quantité primitive, elle n'a donc pas formé autre chose que des anhydrides, et on retrouve, après hydrolyse, la totalité du glycolle primitif.

Mais, par la suite, le chiffre du glycolle total après régénération hydrolytique, se met à baisser lui aussi. On peut donc se demander si cette perte définitive du glycolle résulte tout simplement du départ d'une partie de la cyclo-glycyl-glycine (2 5-diacipipérazine), volatilisée dans l'atmosphère, ou bien s'il ne se formerait pas en même temps des produits de transformation du glycolle autres que les anhydrides et incapables, par conséquent, de régénérer par hydrolyse le glycolle initial.

Le problème est très facile à résoudre dans le cas où ces produits de transformation éventuels, autres que les anhydrides, auraient conservé tout ou partie de l'azote. En effet, s'il existe dans le mélange des substances azotées autres que le glycolle et ses anhydrides, le chiffre de l'azote total doit être supérieur à celui qui correspond au glycolle total. S'il n'existe pas de telles substances azotées, le chiffre de l'azote total doit coïncider avec celui qu'on déduirait du glycolle total.

Il était donc très intéressant d'effectuer sur la série des échantillons le dosage de l'azote total. En prévision de cette éventualité, j'avais eu soin de mettre en réserve dès le premier jour les prises d'essai nécessaires. De chaque solution (échantillon chauffé dilué à 100 cc.) avaient été introduits 10 cc. dans un matras à long col, avec 10 cc. d'acide sulfurique, et les matras avaient été conservés, bien bouchés au liège, pendant les quelques jours nécessaires aux dosages précédents. Chaque matras reçoit alors 5 gr. de phosphate disodique cristallisé et 4 gr. d'un mélange formé de : (Sulfate de cuivre cristallisé, 10 gr.; Sulfate de potassium cristallisé, 90 gr.). On chauffe sur les brûleurs spéciaux jusqu'à cessation du dégagement de vapeur d'eau, puis on ajoute de

nouveau 10 cc. d'acide sulfurique et on continue la chauffe en ne maintenant qu'un très léger début d'ébullition. Les matras exigent une surveillance constante et une agitation fréquente, à cause de la glycérine qui mousse beaucoup et résiste à l'oxydation : il a fallu plusieurs jours de chauffe pour terminer l'attaque. (Par la suite, diverses observations ont permis d'accélérer considérablement l'attaque, grâce à certaines précautions ; mais comme ces précautions n'ont été imaginées que tardivement, une série complète de dosages d'azote a été effectuée par le procédé lent, et ce sont ces résultats qui figurent ici).

Le produit de l'attaque sulfurique est alors transporté comme à l'ordinaire dans un ballon relié au serpentin d'Aubin, et distillé en présence d'un excès de soude ; l'ammoniaque est recueillie dans 20 cc. d'acide sulfurique quart-normal, contenant 1 goutte de rouge d'alizarine en solution aqueuse à 1 0/0. Après contrôle, au réactif de Nessler, de la fin de la distillation ammoniacale, l'excès d'acide est neutralisé par n cc. de soude N/4, et la différence $(20-n)$ représente le volume d'ammoniaque quart-normale fourni par la prise d'essai. Etant donné le titre des liqueurs employées dans tout l'ensemble de ces expériences, on se souvient que le volume d'ammoniaque N/4 fourni par la quantité initiale de glyocolle contenu dans une prise d'essai, devrait être théoriquement 10 cc. 66...

Le tableau suivant indique, pour chacun des 25 échantillons, sauf pour les 10 premiers où l'azote initial était évidemment demeuré en totalité, le volume d'ammoniaque N/4 dégagé. En constatant que, pour 100 0/0 d'azote initial resté présent, on trouve le chiffre 10 cc. 70, on a calculé la proportion de l'azote initial restée présente dans chaque échantillon :

Dosage de l'azote total :

Numéro de l'essai	Durée du chauffage	Azote total (en ammoniaque N/4)	Azote total (0/0 de la quan- tité primitive)
N ^o 0. . .	Témoin non chauffé		
N ^o 1. . .	Passage à 125°		
N ^o 2. . .	Passage à 150°		
N ^o 3. . .	Arrivée à 175°		
N ^o 4. . .	1/2 heure à 175°		
N ^o 5. . .	1 heure »		
N ^o 6. . .	1 h. 1/2 »		
N ^o 7. . .	2 h. »		
N ^o 8. . .	2 h. 1/2 »		

N ^o 9.	. . .	3 h.	»		
N ^o 10.	. . .	3 h. 1/2	»	10 cc. 65	100 0/0
N ^o 11.	. . .	4 h.	»	10 cc. 70	100
N ^o 12.	. . .	4 h. 1/2	»	10 cc. 70	100
N ^o 13.	. . .	5 h.	»	10 cc. 70	100
N ^o 14.	. . .	5 h. 1/2	»	10 cc. 75	100
N ^o 15.	. . .	6 h.	»	10 cc. 45	98
N ^o 16.	. . .	6 h. 1/2	»	9 cc. 65	90
N ^o 17.	. . .	7 h.	»	9 cc. 65	90
N ^o 18.	. . .	7 h. 1/2	»	9 cc. 95	93
N ^o 19.	. . .	8 h.	»	10 cc. 00	93,5
N ^o 20.	. . .	8 h. 1/2	»	9 cc. 20	86
N ^o 21.	. . .	9 h.	»	8 cc. 00	75
N ^o 22.	. . .	9 h. 1/2	»	8 cc. 20	76,5
N ^o 23.	. . .	10 h.	»	7 cc. 65	71,5
N ^o 24.	. . .	10 h. 1/2	»	(dosage perdu)	

On voit que pendant 5 heures 1/2 de séjour à 175°, les mélanges chauffés ne perdent pas d'azote ; puis l'azote total commence à baisser un peu après que le glyco colle total avait commencé à baisser dans la série de dosages précédente. On retrouve ici, dans l'allure de cette baisse, les mêmes irrégularités qu'on avait déjà constatées dans le dosage du glyco colle total ; mais, chose curieuse, ces irrégularités sont tout à fait parallèles dans les deux séries de dosages, ce qui prouve jusqu'à l'évidence qu'elles ne proviennent pas d'inexactitudes dans les déterminations, mais bien de causes communes inhérentes aux échantillons eux-mêmes.

Parmi ces causes il convient de rappeler d'abord les irrégularités de chauffage indiquées dès le début de ce chapitre, dues à l'inégale répartition de la température dans l'enceinte de l'étuve, et qui empêchent la courbe des dosages, en fonction du temps de chauffe, d'avoir une allure bien régulière. Ensuite il faut rappeler aussi un fait déjà signalé à propos de l'évaluation approximative de la matière colorante brune. A partir de l'échantillon n° 17 (7 heures de séjour à 175°) on trouve dans la masse des granulations insolubles dans l'eau. A vrai dire, la majeure partie de ces granulations a été mise en suspension dans la solution aqueuse, et lors du prélèvement, à la pipette, des prises d'essai, on s'est efforcé de rendre cette suspension homogène par une agitation aussi parfaite que possible ; mais dans certains échantillons, des parcelles de la matière insoluble étaient restées adhérentes à la paroi du vase de verre, avec une telle force que le grattage n'avait pu les détacher, d'où une petite cause d'erreur sur les deux dosages à la fois.

Quoi qu'il en soit, le dosage de l'azote a donné les résultats intéressants qu'on en attendait. Constamment supérieur, à partir de 5 heures de séjour à 175°, au chiffre fourni par le glyocolle et ses anhydrides, le chiffre de l'azote total prouve qu'il y a dès ce moment, dans le mélange, des produits azotés de transformation du glyocolle, autres que les anhydrides. L'azote contenu dans ces substances peut atteindre le cinquième de l'azote total (n° 21).

La coïncidence entre la formation de ces dérivés glyocolliques autres que les anhydrides, d'une part, et l'abondante production de matière brune, d'autre part, suggère immédiatement la pensée que le produit spécial de transformation du glyocolle n'est autre précisément que la matière brune. Des expériences de contrôle ont d'ailleurs montré que la glycérine à elle seule est incapable de produire cette matière, même par un séjour très prolongé à 175°.

Recherche de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine). — Il était intéressant de voir si la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) commence à se former dès qu'une fraction du glyocolle commence à disparaître, ou si au contraire la cyclisation par anhydri-sation double ne se produirait qu'après une phase antérieure consacrée à la formation de glycyl-glycine par anhydri-sation simple sans cyclisa-tion.

Pour faciliter la recherche de la cyclo-glycyl-glycine, une petite fraction de chacune des solutions étudiées a été bouillie avec une sus-pension aqueuse d'oxyde cuivrique, afin de faire passer à l'état de com-binaisons cuivriques bleues toutes les substances à chaîne ouverte qui pourraient être présentes (glyocolle, glycyl-glycine, triglycyl gly-cine). Des gouttes de la solution bleue, évaporées sur lame, permettent de reconnaître alors très facilement dans le résidu, à côté des aiguilles bleues, les grands feuillets ou les dendrites foliacées incolores de la cyclo-glycyl-glycine, tels qu'ils ont été décrits dans le chapitre consacré à cette substance.

Pour les échantillons riches en cyclo-glycyl-glycine, on peut même d'abord évaporer au bain-marie la solution glycérinée, puis l'addition-ner d'alcool de manière à produire un précipité cristallin : c'est ce pré-cipité cristallin qui, séparé du lavage alcoolique glycériné, est redis-sous dans l'eau et bouilli avec l'oxyde de cuivre. Dans ces conditions, la cristallisation des gouttes sur lame est rendue plus commode par suite de l'élimination de la glycérine. C'est ainsi que la cyclo-glycyl-gly-cine (2.5.diacipipérazine) a été reconnue très facilement dans les échantillons nos 12, 11, 10, 9.

Dans les échantillons nos 8, 7, 6, la cyclo-glycyl-glycine n'a pu être décelée après élimination de la glycérine par lavage alcoolique, sans doute parce que la faible quantité présente de cette cyclo-glycyl-glycine était perdue dans les lavages. Mais en faisant la recherche directement sans élimination de la glycérine, j'ai pu observer sur ces trois échantillons quelques cristaux peu abondants, mais caractéristiques, de cyclo-glycyl-glycine.

Dans les échantillons nos 5, 4, 3, la recherche a échoué complètement.

Il est donc certain que l'apparition de la cyclo-glycyl-glycine est contemporaine du commencement de la disparition du glycocole, et se fait *dès le début* de la condensation de l'acide.

Recherche de la glycyl-glycine. — Malgré la formation constatée de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) dès le début de la condensation du glycocole, il était intéressant de rechercher aussi s'il ne se produirait pas à cette période une petite quantité de glycyl-glycine, substance qu'on peut concevoir théoriquement comme précurseur à la fois de la cyclo-glycyl-glycine et de la triglycyl-glycine.

J'ai donc tenté cette recherche sur les échantillons nos 8, 10, 12, 14, ayant subi respectivement pendant 2 heures 1/2, 3 heures 1/2, 4 heures 1/2, 5 heures 1/2, la température 175°, et qui appartiennent précisément à la période du début de la condensation. On a vu, dans le chapitre spécialement consacré à la glycyl-glycine, les procédés mis en œuvre pour cette recherche, et les résultats nuls qu'ils ont donnés.

La formation de glycyl-glycine au début de la condensation du glycocole n'a donc pu être mise en évidence : si elle a lieu, ce ne peut être évidemment que dans une mesure très restreinte ; mais je ne me crois pas autorisé néanmoins à la nier d'une façon catégorique.

Présence de la cyclo-polyglycyl-glycine (anhydride « corné »). — On a vu que dans certains échantillons (nos 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24) il s'était formé un peu de matière insoluble partiellement adhérente au verre, et se présentant pour le surplus sous forme de granulations en suspension. Dans le n° 20, ces granulations étaient restées particulièrement fines.

Sur deux échantillons (n° 18 et n° 22), la petite portion de liquide restant après les dosages a été centrifugée ; le petit résidu de granulations a été lavé plusieurs fois par centrifugation dans l'eau bouillante, puis bouilli avec H^2SO^4 étendu qui le dissout peu à peu, saturé par $BaCO^3$, filtré, enfin bouilli avec un peu d'oxyde de cuivre en suspension.

On obtient une coloration bleue du liquide, révélant la présence d'un aminoacide régénéré. Les granulations étudiées sont donc bien formées de cyclo-polyglycyl-glycine insoluble (anhydride « corné » de BALBIANO et TRASCIATTI).

Synthèse des résultats. — Toutes les déterminations numériques qui viennent d'être relatées prennent un grand intérêt lorsqu'on les rapproche chronologiquement pour comparer la marche simultanée des diverses séries de chiffres : de l'ensemble résulte, avec une évidence frappante et une remarquable netteté, l'explication complète des phénomènes de condensation qui se passent lorsqu'on chauffe le glycocolle en présence de la glycérine.

Il faut donc avant tout réunir en un seul tableau les chiffres indiquant, pour chacun des 25 échantillons, la proportion du glycocolle demeurée libre, la proportion demeurée tant à l'état libre qu'à l'état d'anhydrides réhydrolysables, la proportion de l'azote total restée présente. En retranchant convenablement les uns des autres les chiffres de ces trois séries expérimentales, on connaît la proportion du glycocolle passée à l'état d'anhydrides, celle qui a subi une transformation différente, enfin celle qui s'est échappée dans l'atmosphère sous forme de 2.5.diacipipérazine. Toutes ces valeurs numériques sont réunies dans le *Tableau général de la condensation progressive*.

Les données numériques du *Tableau général* sont traduites d'autre part dans les courbes annexées au présent chapitre, qui représentent la marche horaire des phénomènes de condensation du glycocolle au sein de la glycérine.

En abscisses sont portées les durées de séjour à 175°, le zéro correspondant à l'instant où l'étuve atteint la température 175°. En ordonnées sont portés les chiffres exprimant la proportion centésimale, par rapport au glycocolle initial, du glycocolle resté libre dans chaque échantillon (courbe GL), du glycocolle resté libre ou passé à l'état d'anhydrides réhydrolysables (courbe GT), enfin de l'azote total (courbe N). Les ordonnées comprises entre la courbe GT et la courbe GL représentent la fraction centésimale du glycocolle qui est passée à l'état d'anhydrides ; les ordonnées comprises entre la courbe N et la courbe GT représentent la fraction centésimale du glycocolle initial qui est passée sous forme de corps azotés autres que les anhydrides (matière brune). Enfin les ordonnées comprises entre une parallèle à l'axe des x passant par le point 100, et la courbe N, traduisent la proportion du glycocolle perdue par la préparation, notamment par la volatilisation de la cyclo-glycyl-glycine.

Tableau général de la condensation progressive

Numéro de l'essai	Durée du chauffage	Matière brune	Substance bactériologique	Cyclo- glycyl- glycine	Cyclopoly- glycyl- glycine	Glycocolle libre	Glycocolle anhydride	Glycocolle trans- forme	Glycocolle disparu
0	Témoin non chauffé	.	.	.	.	100 %			
1	Passage à 125°	.	.	.	.	100			
2	Passage à 150°	.	.	.	.	100			
3	Arrivée à 175°	.	.	.	.	100			
4	1/2 heure à 175°	.	.	.	.	100			
5	1 heure	.	.	.	.	100	0		
6	1 h. 1/2	2	?	+	.	97	3		
7	2 h.	1	.	+	.	99	1		
8	2 h. 1/2	1	.	+	.	97,5	2,5		
9	3 h.	2	traces	++	.	96	4		
10	3 h. 1/2	6	3	++	.	82,5	17,5	0	0
11	4 h.	41	6	++	.	75	25	0	0
12	4 h. 1/2	16	40	++	.	69	31	0	0
13	5 h.	48	15	++	.	65	35	0	0
14	5 h. 1/2	330	25	++	.	17	75	8	0
15	6 h.	730	45	++	.	11	80	7	2
16	6 h. 1/2	2600	55	++	.	1	79	40	10
17	7 h.	(2600)	60	++	+	0	80	40	10
18	7 h. 1/2	(1740)	24	++	++	0	85	8	7
19	8 h.	(1460)	46	++	++	.	84	9,5	6,5
20	8 h. 1/2	3040	13	++	++	.	72	14	14
21	9 h.	X	6	++	+	.	59	16	25
22	9 h. 1/2	X	4	++	++	.	65	14,5	23,5
23	10 h.	X	2	++	++	.	55	16,5	28,5
24	10 h. 1/2	X	traces	++	++	.	55	X	X

Les trois courbes GL, GT, N, représentent des dosages véritables ; elles sont construites à la même échelle, et rigoureusement comparables. D'autre part la figure comporte aussi d'autres courbes qui n'ont plus aucune relation d'échelle avec les trois précédentes, ni entre elles, et qui traduisent seulement des évaluations approximatives. La courbe C représente les variations de la matière colorante ; mais comme l'échelle adoptée pour les nos 6 à 13 amène la courbe C à sortir brusquement des limites de la feuille, elle est accompagnée d'une autre courbe *c*, à échelle 20 fois plus réduite. La branche pointillée *c'* de cette courbe correspond à la période où la matière brune, se fixant sur les granulations de cyclo-polyglycyl-glycine, échappe à l'évaluation ; l'origine de la branche *c'* révèle ainsi dans une certaine mesure le début de la formation de cyclo-polyglycyl-glycine. Enfin la courbe Bi représente l'intensité de la réaction biurétique (triglycyl-glycine) fournie par les échantillons successifs.

Conclusions.— Un simple coup d'œil jeté sur l'ensemble des courbes permet directement les constatations suivantes, qui s'imposent avec la plus grande netteté.

1° Pendant les premiers temps du séjour à 175° (période où se volatilise l'eau de dissolution), il ne se produit aucune condensation ni aucune altération du glycocolle.

2° Après 1 heure 1/2 ou 2 heures de séjour à 175°, le glycocolle libre commence à disparaître par condensation, en formant exclusivement des anhydrides, et sans subir ni transformations d'un autre genre, ni pertes. Le mélange de réaction ne prend encore qu'une coloration insignifiante. Cette période d'anhydrisation simple, partielle et lente, se poursuit jusqu'au bout de la 5^e heure ; le glycocolle libre est alors tombé à 65 0/0 de la quantité primitive ; les 35 0/0 manquant se retrouvent tout entiers à l'état d'anhydrides hydrolysables. On a vu que la glycyl-glycine, recherchée au cours de cette période, n'a pu être décelée.

3° Dès cette première période, on constate que les processus de condensation se poursuivent simultanément par deux voies différentes. L'un donne lieu immédiatement à un corps cyclisé par anhydrisation totale, un cyclodipeptide, la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine). L'autre processus fournit un corps à chaîne plus longue mais non fermée, un tétrapeptide à chaîne ouverte, la triglycyl-glycine, dont les progrès sont révélés par la réaction du biuret.

4° Après la 5^e heure, alors que la disparition de l'eau de dissolution paraît complète, la proportion de glycocolle restée libre baisse brus-

quement jusqu'à tomber en une demi-heure de 65 0/0 à 17 0/0 de la quantité primitive. Puis le glycolle achève de se condenser : après 6 heures 1/2 sa disparition est presque totale ; au bout de la 7^e heure on n'en trouve plus trace.

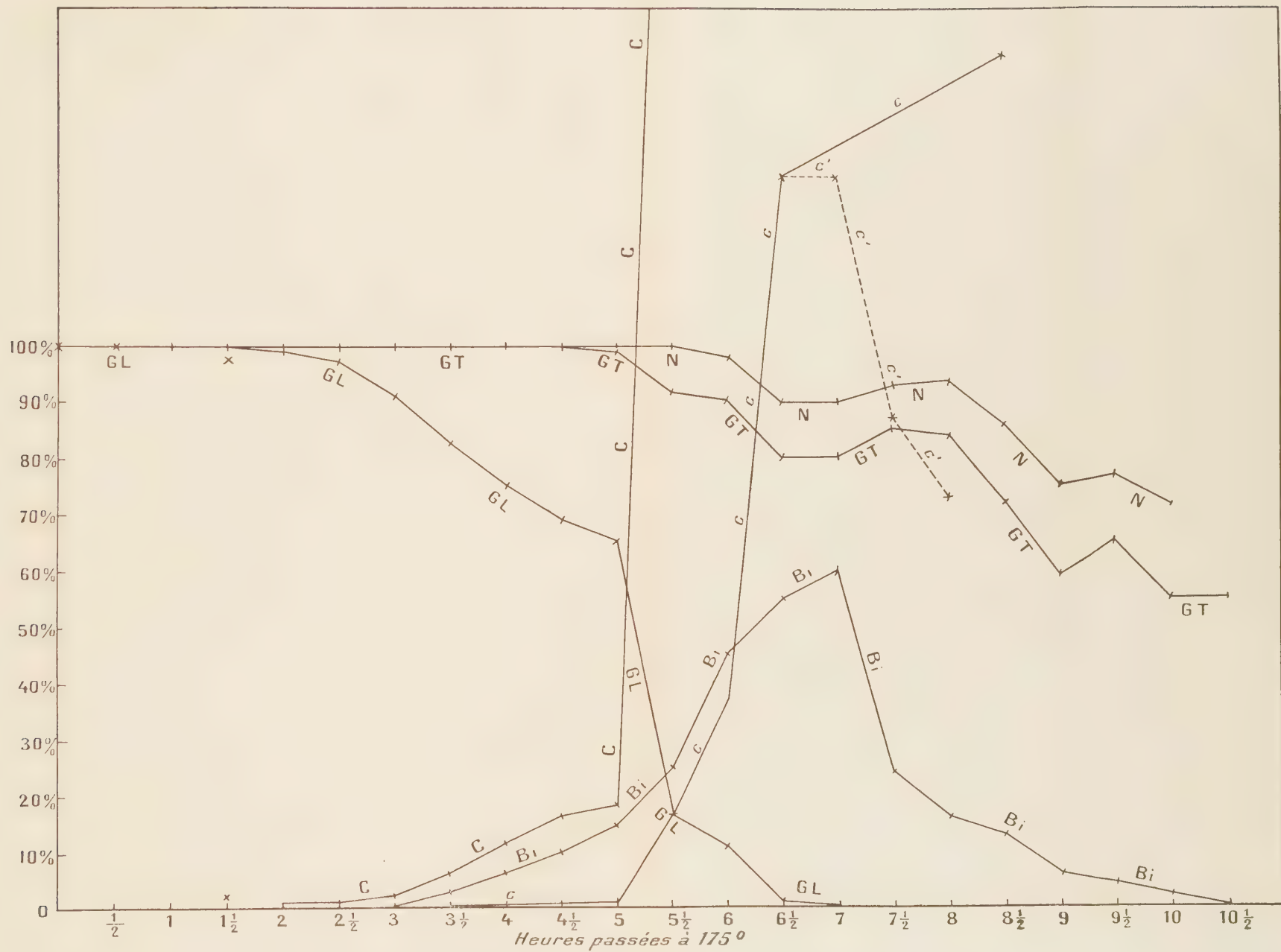
5^o Au moment même où se produit la chute brusque du glycolle, se développe aussi brusquement la coloration brune du mélange de réaction, et les deux courbes de l'azote total et du glycolle total se séparent brusquement, révélant ainsi l'apparition d'un dérivé azoté du glycolle autre que les anhydrides. Une telle coïncidence classe aussitôt la matière brune comme produit azoté dérivant du glycolle. Mais le fait que le glycolle initial peut baisser de 35 0/0 de sa valeur sans produire de la matière brune, et qu'au contraire celle-ci ne s'accroît qu'après la disparition presque complète du glycolle, montre que la matière brune n'est pas un dérivé de transformation directe du glycolle : il existe un intermédiaire. Enfin le fait que les produits autres que les anhydrides (matière brune) atteignent d'emblée 10 0/0 du glycolle initial, rapproché de l'abondance de la 2.5.diacipipérazine par rapport à la triglycyl-glycine (peu abondante), donne à penser que cet intermédiaire doit être la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) elle-même.

6^o Pendant tout le temps qu'il existe encore du glycolle libre (jusqu'au bout de la 7^e heure), la triglycyl-glycine (biurétique) ne cesse d'augmenter : son accroissement s'arrête aussitôt que le glycolle a totalement disparu. La triglycyl glycine dérive donc du glycolle, mais non de la cyclo-glycyl-glycine : on ne voit pas d'ailleurs comment l'anhydrisation de celle-ci pourrait rétrograder.

7^o Au moment même où les dernières traces de glycolle ont disparu, la triglycyl-glycine tombe brusquement, protégée qu'elle était auparavant contre l'anhydrisation par le glycolle lui-même, et demeurant désormais le seul corps anhydrisable du mélange.

8^o C'est au moment même où commence la disparition de la triglycyl-glycine, qu'apparaissent les granulations insolubles de l'anhydride « corné » : ce corps est donc un dérivé de la triglycyl-glycine, aux dépens de laquelle il prend naissance par anhydrisation ; cette cyclo-polyglycyl-glycine est un cyclotétrapeptide ou un cyclooctopeptide, la cyclo-triglycyl-glycine ou la cyclo-heptaglycyl-glycine.

9^o La perte en azote échappé hors des vases à réaction, commence au moment où le glycolle est tombé à 17 0/0 de sa quantité primitive, et où le milieu glycériné est devenu très riche en cyclo-glycyl-glycine : cette circonstance, jointe à l'odeur des vapeurs qui s'échappent de



Marche horaire des transformations du glycolle au sein de la glycérine.

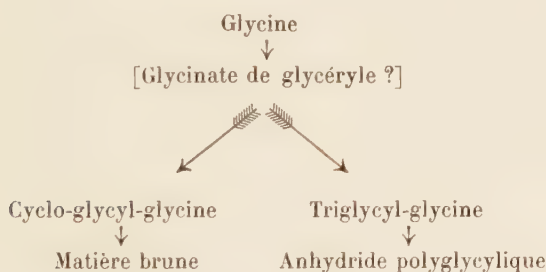
l'étuve, permet d'attribuer la perte en azote à la volatilisation de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine).

10° L'ensemble de ces constatations permet de se rendre un compte très net de l'enchaînement des phénomènes de condensation que subit le glyocolle chauffé au sein de la glycérine. Ces phénomènes se groupent en deux séries d'importance quantitative inégale, mais qui se poursuivent parallèlement et indépendamment l'une de l'autre. Ces deux séries pourraient avoir un stade précurseur commun, la formation de glycyl-glycine, mais on a vu que la présence de ce corps n'a pu être établie. Nous étudierons plus loin la question de savoir si le stade précurseur commun ne serait pas un éther glycérique du glyocolle.

La première série comprend la formation abondante de cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine), puis la production de matière brune azotée aux dépens de cette cyclo-glycyl-glycine (par déshydratation probablement).

La deuxième série, tout à fait indépendante de la première, comprend la formation de triglycyl-glycine, puis l'anhydridisation de celle-ci en anhydride polyglycylique insoluble (cyclo-heptaglycyl-glycine ?).

On peut résumer ces phénomènes dans le schéma suivant :



Nous allons examiner l'influence remarquable de la proportion de glycérine sur la prépondérance relative de l'une ou l'autre série de réactions.

CHAPITRE IX

INFLUENCE DE LA PROPORTION DE GLYCÉRINE

Au début du présent travail, j'ai indiqué les raisons qui m'avaient engagé à mêler le glyocolle *dissous dans l'eau* avec un *notable excès* de glycérine, et j'ai signalé la divergence des résultats ainsi obtenus avec ceux des expériences de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI (1).

Dans le but d'obtenir des indications plus précises sur le rôle que joue la proportion plus ou moins forte de glycérine mêlée au glyocolle, j'ai institué l'expérience suivante.

Sept petits vases cylindriques (tubes à fond plat, mesurant environ 28 millimètres de diamètre intérieur et 6 centimètres de hauteur, contenance approximative 35 cc) reçoivent respectivement 12 gr. 00, 10 gr. 00, 8 gr. 00, 6 gr. 00, 4 gr. 00, 2 gr. 00, 1 gr. 00, de glycérine à 30° B. Dans chacun on ajoute 10 cc. d'une solution de glyocolle pur à 20 0/0, soit 2 gr. 00 de glyocolle, on mélange intimement, et enfin, par addition d'eau convenable, on porte tous les essais à un volume uniforme de 30 cc. Une expérience préliminaire avait montré que cette addition d'eau est nécessaire dans les tubes pauvres en glycérine, pour empêcher la dessiccation d'être trop rapide et pour éviter que le glyocolle se dépose, dès les premiers temps de chauffe, en gros cristaux qui échappent à toute réaction ultérieure.

Les 7 essais, qui contiennent donc le glyocolle mêlé à des proportions de glycérine variant de 6 fois à 1/2 fois son propre poids, sont placés côte à côte sur la tablette de l'étuve à air. Après 1 heure 1/2

1. L. BALBIANO u. D. TRASCIATTI. Ueber ein neues Derivat des Glykokolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 33, 2323, 1900). — L. BALBIANO. Ueber ein neues Glykokollanhydrid (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 1501, 1901). — L. BALBIANO. Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, I, 410, 1902).

environ employée à porter l'étuve à 175°, la température est maintenue pendant 9 nouvelles heures aux alentours de 173° (172°-175°). L'eau s'est échappée, le contenu des vases a bruni comme à l'ordinaire puis a noirci fortement, surtout dans les tubes n° 6 et n° 7.

Après refroidissement, on trouve sur les parois des tubes 6 et 7 des cristaux blancs assez volumineux, qui paraissent être du glycocolle, alors que le fond des tubes est occupé par une croûte noire, rugueuse et sèche, adhérent au verre. Dans le tube 5, le gâteau noir du fond, plus épais, est recouvert par des efflorescences d'un blanc pur, semblables à des efflorescences de salpêtre, où l'on reconnaît les belles aiguilles sublimées de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine). Ce n'est qu'à partir du tube 4 que la masse pâteuse, quoique très dure, a conservé un volume suffisant pour inclure toutes les substances cristallisées. Enfin, dans les tubes 3, 2, 1, on voit la masse pâteuse acquérir progressivement une fluidité suffisante pour qu'un agitateur puisse s'y mouvoir. Cette simple inspection suffit à montrer que dans la pratique, la proportion de glycérine ne doit pas descendre au-dessous de 4 fois le poids du glycocolle.

Il est facile d'obtenir des renseignements plus précis. Le contenu de chaque tube est délayé dans l'alcool absolu, les parties insolubles sont lavées méthodiquement par ce dissolvant, et recueillies sur filtre plat. L'alcool évaporé laisse un résidu de glycérine accompagnée d'une certaine quantité de substance cristallisée qu'avait dissoute l'alcool : le résidu de glycérine est quasi nul pour l'échantillon 7, insignifiant pour l'échantillon 6 ; dans les autres il est en rapport avec la quantité de glycérine mise en œuvre, et fortement coloré en brun.

La partie insoluble dans l'alcool absolu, de couleur noirâtre, est chassée par un jet d'eau bouillante dans une fiole où elle est soumise à un épuisement méthodique par l'eau chaude, et les parties insolubles dans l'eau bouillante sont recueillies sur filtre taré. Insignifiante pour le n° 1, cette fraction insoluble dans l'eau bouillante est considérable pour les n°s 6 et 7. Elle est pesée sur le filtre après dessiccation à 110°.

La solution aqueuse est fortement colorée en brun ; elle est recueillie ainsi que les lavages, concentrée, évaporée à sec dans un petit cristalliseur taré, et pesée après dessiccation : on a ainsi le poids global des substances cristallisées (cyclo-glycyl-glycine, excès éventuel de glycocolle) et de la matière brune qui les accompagne.

Le résidu sec est repris par l'eau bouillante (environ 50 cc.), additionné d'un peu de noir animal (environ 1 gr.), et digéré au bain-

marie (1). La solution est filtrée sur un entonnoir à la trompe, et le résidu de noir animal est épuisé de nouveau par l'eau au bain-marie. Cet épuisement est répété 5 fois en général (jusqu'à cessation de résidu dans l'eau de lavage) ; puis tous les lavages sont débarrassés des dernières traces de noir animal par filtration au papier. Le liquide est évaporé à siccité dans un petit cristalliseur taré ; le résidu est séché et pesé. Cette opération donne le poids des substances cristallines débarrassées de matière brune ; la différence avec la pesée précédente donne le poids des matières brunes fixées par le noir animal.

Toutes les données de ce fractionnement sont résumées dans le tableau suivant :

N ^o de l'essai	Poids de glycocolle	Poids de glycérine	Insoluble dans l'eau	Cristaux blancs et matière brune	Cristaux décolorés	Matière brune
			gr.	gr.	gr.	gr.
1	2 gr.	12 gr.	0,0049	0,6480	0,5727	0,0753
2	12 gr.	10 gr.	0,0032	0,8334	0,7299	0,1035
3	10 gr.	8 gr.	0,1092	1,0007	0,8848	0,1159
4	10 gr.	6 gr.	0,2096	0,9068	0,8055	0,1013
5	10 gr.	4 gr.	0,3354	0,8074	0,6056	0,2018
6	2 gr.	2 gr.	0,6286	1,2557	1,1177	0,1380
7	2 gr.	1 gr.	0,5102	1,3772	1,1724	0,2048

(Dans l'essai n^o 2, il s'était produit, au cours du chauffage à 173°, une petite projection, d'où légère incertitude sur les chiffres qui le concernent).

Enfin, la simple inspection des derniers tubes avait permis de reconnaître sur leurs parois la présence de cristaux de glycocolle ayant échappé à la réaction. Il était intéressant de doser ce glycocolle. Pour cela, chacun des résidus cristallins, pesé après décoloration au noir, a été redissous dans 50 cc. d'eau ; 10 cc. de cette solution ont été prélevés, additionnés de 4 gouttes de phénolphthaléine en solution alcoolique à 10/0, puis de soude quart-normale jusqu'à légère teinte rose. On ajoute alors 50 cc. de formol (solution commerciale étendue de son volume d'eau et neutralisée par la soude en présence de phénolphthaléine jusqu'à légère teinte rose), ce qui décolore la solution ; puis on verse de nouveau la soude jusqu'à première réapparition de la teinte rose. Voici les chiffres observés :

1. Dans les échantillons 5, 6, 7, la décoloration se fait mal, et la solution, même après passage au noir, contient encore un peu de matière brune

Numéro de l'essai	Addition de soude N/4 jusqu'à		Soude N/4 consommée par le glycolle
	1 ^{er} virage	2 ^e virage	
1	0 cc. 15	0 cc. 20	0 cc. 05
2	0 cc. 15	0 cc. 20	0 cc. 05
3	0 cc. 20	0 cc. 25	0 cc. 05
4	0 cc. 20	0 cc. 40	0 cc. 20
5	0 cc. 35	0 cc. 70	0 cc. 35
6	0 cc. 50	2 cc. 25	1 cc. 75
7	0 cc. 80	7 cc. 20	6 cc. 40

Pour les essais 5, 6, 7, mal décolorés, les virages sont assez difficiles à observer.

Dans les essais 1, 2, 3, il est certain que le glycolle est complètement absent : le chiffre trouvé doit donc être considéré comme une erreur limite méthodique (due peut-être à la présence d'un peu de tri-glycyl-glycine). Si on le retranche partout, si on multiplie le reste par $\frac{50 \text{ cc.}}{40 \text{ cc.}} = 5$; enfin si on se souvient que 1 cc. de NaOH quart-normale représente 0 gr. 01875 de glycolle, on trouve les résultats suivants :

Numéro de l'essai	Soude N/4 consommée par le glycolle	Glycolle inaltéré	Cyclo-glycyl-glycine extraite
1	0 cc. 00	0	0 gr. 5727
2	0 cc. 00	0	0 gr. 7299
3	0 cc. 00	0	0 gr. 8848
4	0 cc. 75	0 gr. 0144	0 gr. 7914
5	1 cc. 50	0 gr. 0281	0 gr. 5775
6	8 cc. 50	0 gr. 1594	0 gr. 9583
7	31 cc. 75	0 gr. 5953	0 gr. 5771

Il est évident qu'en retranchant le chiffre du glycolle du chiffre trouvé pour les cristaux décolorés (mélange de glycolle et de cyclo-glycyl-glycine), on obtiendra le chiffre de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.-diacipipérazine) extraite. C'est ce chiffre qui est porté dans la dernière colonne du tableau précédent.

Nous avons maintenant toutes les données nécessaires pour calculer la proportion du glycolle initial qui a passé sous les divers états. La quantité du glycolle inaltéré a été déterminée par le titrage ; celle qui se retrouve sous forme de cyclo-glycyl-glycine (2.5.-diacipipérazine) se

calcule en multipliant par $\frac{2 \times 75}{114} = 1,3158$ le chiffre de ce dernier corps ; on emploiera le même facteur pour le glycocolle passé à l'état d'anhydride insoluble (cyclo-polyglycyl-glycine) $(C^2H^3NO)^n$. Enfin, bien que la constitution de la matière brune ne soit pas actuellement déterminée, on pourra obtenir une évaluation approximative du glycocolle qui l'a fournie, en employant encore le même facteur que pour la cyclo-glycyl-glycine. La quantité de glycocolle manquante correspond à la perte de cyclo-glycyl-glycine par volatilisation, et à la quantité de cette substance qui reste dissoute dans les lavages alcooliques du magma glycérineux. Voici les résultats :

Numéro de l'essai	Glycocolle retrouvé à l'état de				Glycocolle manquant
	Glycocolle	Cycloglycyl- glycine	Cyclopoly- glycyl- glycine	Matière brune	
1	0	0 gr. 7536	0 gr. 0064	0 gr. 0991	1 gr. 1409
2	0	0 gr. 9604	0 gr. 0042	0 gr. 1361	0 gr. 8993
3	0	1 gr. 1642	0 gr. 1437	0 gr. 1525	0 gr. 5396
4	0 gr. 0141	1 gr. 0413	0 gr. 2758	0 gr. 1333	0 gr. 5355
5	0 gr. 0281	0 gr. 7599	0 gr. 4413	0 gr. 2655	0 gr. 5052
6	0 gr. 1594	1 gr. 2609	0 gr. 8271	0 gr. 1816	(-0 gr. 4290)
7	0 gr. 5953	0 gr. 7593	0 gr. 6713	0 gr. 2695	(-0 gr. 2954)

La lecture de ce tableau devient plus facile si l'on rapporte tous les chiffres à 100 parties du glycocolle primitif : ce sont ces proportions centésimales qui sont inscrites dans le tableau suivant :

N° de l'essai	Proportion de glycérine	Glycocolle retrouvé à l'état de				Glycocolle manquant
		Glycocolle	Cyclo- glycyl- glycine	Cyclopoly- glycyl- glycine	Matière brune	
1	6 parties	0 %	37,7 %	0,3 %	5,0 %	57,0 %
2	5 parties	0	48,0	0,2	6,8	45,0
3	4 parties	0	53,2	7,2	7,6	27,0
4	3 parties	0,7	52,7	13,8	6,7	26,8
5	2 parties	1,4	38,0	22,1	13,3	25,3
6	1 partie	8,0	63,0	41,4	9,1	(-21,4)
7	1/2 partie	29,8	38,0	33,6	13,5	(-14,8)

On voit que ces essais de rendement n'ont pas la prétention d'une grande rigueur, car pour les numéros 6 et 7 on trouve, en totalisant les diverses fractions, un chiffre supérieur à 100 0/0 par rapport au glycocolle primitif.

Il ne faudrait pas, je crois, en conclure qu'une substance autre que le

glycocolle, en l'espèce la glycérine, aurait pris part à la constitution des substances retrouvées ; mais il convient plutôt d'attribuer cet écart au défaut de précision des procédés de fractionnement. Le lavage alcoolique peut facilement laisser un peu de glycérine adhérente aux parcelles solides, ou plutôt incluse dans leur intérieur. La digestion avec le noir animal ne va peut-être pas sans introduire un peu de matière étrangère. Enfin, et surtout, la difficulté d'observer les virages, a peut-être fait trouver des chiffres de glycocolle trop faibles, ce que je serais porté à croire en raison de l'apparence volumineuse du résidu de glycocolle : une erreur par défaut dans ce cas donne une erreur par excès sur la cyclo-glycyl-glycine, c'est-à-dire sur le total calculé en glycocolle.

Malgré son peu de précision quantitative, cette série d'essais me paraît instructive, en ce qu'elle éclaire les conditions les plus favorables à la production de la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine). Il faut éviter de chauffer le glycocolle en présence d'une quantité trop faible de glycérine, car une partie du glycocolle échappe à la réaction, ce qui compliquerait beaucoup l'isolement de la cyclo-glycyl glycine, et d'autre part une fraction très importante du glycocolle transformé passe à l'état insoluble d'anhydride amorphe polyglycylique.

Les meilleures proportions sont celles qui mettent en œuvre 4 parties de glycérine à 30° B. pour 1 partie de glycocolle. La disparition du glycocolle est alors intégrale. La perte par volatilisation ou dans les lavages alcooliques ne dépasse pas un quart, et peut être restreinte si l'on évite d'employer trop d'alcool pour les lavages. Le rendement pratique en cyclo-glycyl-glycine, pure d'emblée, dépasse 50 0/0, et peut s'élever facilement par des précautions à observer dans les lavages alcooliques (1). L'anhydride polyglycylique amorphe n'est produit qu'en quantité minime, et s'élimine directement par filtration.

Pour une proportion de glycérine supérieure à 4 fois le poids du glycocolle, la réaction fournit aussi très commodément la cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine), et la proportion d'anhydride insoluble formé diminue encore jusqu'à devenir insignifiante. Mais il n'y a pas d'avantage à employer cet excès de glycérine, car on augmente alors la quantité de cyclo-glycyl-glycine perdue dans les lavages alcooliques.

(1) En étudiant précédemment la préparation de la cyclo glycyl-glycine, j'ai indiqué des rendements de 70-80 0/0. Il ne faudrait pas considérer comme une contradiction le chiffre de 50 0/0 donné ici, car les expériences qui font l'objet du présent chapitre avaient un but spécial de fractionnement, et l'alcool a été employé largement pour les lavages. En évaporant ces lavages, on détermine, surtout dans les essais 1, 2, 3, une cristallisation assez abondante de cyclo-glycyl-glycine, qui peut-être récupérée.

Il est très intéressant de remarquer que *la faible teneur en glycérine oriente la réaction de deshydratation vers la production de l'anhydride insoluble polyglycylique* (par l'intermédiaire de la triglycyl-glycine). C'est la raison pour laquelle L. BALBIANO et D. TRASCIATTI avaient obtenu des résultats différents des miens ; pour 20 gr. de glycocolle ils n'employaient que 10 gr. de glycérine, soit 1 2 fois seulement le poids du glycocolle : aussi le produit fondamental résultant de leurs expériences n'était-il autre que l'anhydride « corné » polyglycylique.

CHAPITRE X

MÉCANISME PROBABLE DE LA SYNTHÈSE DES POLYPEPTIDES PAR LA GLYCÉRINE

Nouveauté des résultats du présent travail. — On vient de voir dans les chapitres précédents, que l'action directe d'une substance empruntée à l'organisme, la glycérine, permet d'obtenir très aisément, en partant du *glycocolle*, un dipeptide cyclique (*cyclo-glycyl-glycine*) et par suite le dipeptide linéaire correspondant (*glycyl-glycine*), un tétrapeptide linéaire (*triglycyl-glycine*), un hexapeptide linéaire (*pentaglycyl-glycine*), enfin un polypeptide de rang élevé qui est probablement l'octopeptide cyclique (*cyclo-heptaglycyl-glycine*).

Nous verrons dans la *Deuxième Partie* du travail, que les homologues du *glycocolle*, lorsqu'on les chauffe isolément avec la glycérine, donnent très aisément, comme produit de condensation fondamental, les dipeptides cycliques correspondants, pour lesquels j'ai proposé la dénomination générale de cyclo-glycyl-glycines (Voir l'*Introduction*). Ainsi la sarcosine se transforme en *cyclo-sarcosyl-sarcosine*, l'alanine en *cyclo-alanyl-alanine*, la leucine en *cyclo-leucyl-leucine* : le phénomène est donc général, que la chaîne carbonée soit d'ailleurs substituée à l'azote (cas de la sarcosine), ou au carbone (cas de l'alanine, de la leucine).

Bien plus, ma méthode permet de réaliser directement, non seulement la synthèse des cyclo-glycyl-glycines homogènes (c'est-à-dire où les deux molécules d'acides aminés sont de même espèce), mais aussi la synthèse des cyclo-glycyl-glycines *mixtes*, où les deux molécules d'acides aminés sont d'espèces différentes. On verra dans la *Troisième Partie* du travail qu'il suffit de chauffer avec la glycérine un mélange d'alanine et de glycocolle pour le transformer directement en *cyclo-alanyl-glycine*, un mélange de leucine et de valine pour obtenir une *cyclo-leucyl-valine*, etc... Il aurait pu se faire que chacun des acides aminés en présence subît la réaction isolément pour son propre compte, c'est-à-dire

que dans le mélange équimoléculaire (alanine + glycine), par exemple, le glyocolle donnât ses produits de condensation habituels tandis que l'alanine se transformerait en cyclo alanyl-alanine. Peut-être une minime fraction des aminoacides peut-elle se comporter ainsi, mais elle n'est certainement qu'insignifiante. La réaction fondamentale est celle qui *enchaine les aminocides d'espèces différentes*, et cette constatation ne me semble pas d'importance minime pour expliquer la variété des molécules d'acides aminés qui entrent dans les matières protéiques dont l'organisme vivant effectue la synthèse.

Il est presque superflu de faire remarquer combien était inattendue, avant mes recherches, cette conception du rôle synthétisant de la glycérine, ainsi promue au rang d'un agent protéogène de premier ordre ; on me permettra cependant de rappeler en quelques mots, pour éviter tout malentendu, quel était antérieurement l'état de nos connaissances.

L. BALBIANO et D. TRASCIATTI (1) avaient essayé d'obtenir des glycérides d'acides aminés, en calquant leurs tentatives sur la célèbre synthèse qui avait donné à M. BERTHELOT (2) les glycérides des acides simples, c'est-à-dire en chauffant directement en tube scellé le mélange de l'acide avec l'alcool triatomique. Au point de vue de la synthèse des glycérides d'acides aminés, les essais des auteurs italiens échouèrent complètement, et le seul résultat de leur travail fut la découverte de l'anhydride « corné » du glyocolle, anhydride que j'ai retrouvé moi-même en expliquant sa genèse et sa constitution par ma découverte de la triglycyl-glycine.

La triglycyl-glycine, si caractéristique par sa magnifique réaction du biuret, n'avait pas été vue par eux. Quant à la cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine), elle fut signalée plus tard par L. BALBIANO (3), en petite quantité et à titre tout accessoire, dans les eaux-mères de l'anhydride corné. La cyclo-glycyl-glycine est au contraire, dans la plupart de mes expériences, le produit dominant ; j'ai montré la raison de cette divergence avec les auteurs italiens, en découvrant l'influence remarquable qu'exerce la proportion de glycérine sur le type de condensation qui prédomine : l'excès de glycérine confère la prépondérance à la cyclo-

1. L. BALBIANO u. D. TRASCIATTI. Ueber ein neues Derivat des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 33, 2323, 1900).

2. M. BERTHELOT. Mémoire sur les combinaisons de la glycérine avec les acides et sur la synthèse des principes immédiats des graisses des animaux (*Ann. de Chim. et de Physiq.*, 3^e s., 41, 216, 1854).

3. L. BALBIANO. Ueber ein neues Glykocollanhydrid (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 1501, 1901). — Sopra una nuova anidride della glicocolle (*Gazz. chim. ital.*, 32, 1, 410, 1902).

glycyl-glycine, tandis que la triglycyl-glycine et l'anhydride « corné » qui en dérive deviennent abondants lorsqu'il y a peu de glycérine, ce qui était le cas dans les expériences de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI.

Si l'on voulait savoir à quel point la formation des cyclo-glycyl-glycines (2,5-diacipipérazines) par l'action de la glycérine sur les amino-acides avait échappé à ces auteurs, il suffirait de se reporter à leurs propres écrits (1). « Nous avons étudié inutilement, disent-ils, l'action de la glycérine sur l'alanine ; ici ne semble se produire aucun changement » (2). Or on verra plus loin, tout au contraire, que l'alanine chauffée en présence de la glycérine se transforme en cyclo-alanyl-alanine, et cela si simplement, avec des rendements si satisfaisants, qu'on peut considérer ma méthode comme le procédé de choix pour la préparation de ce dipeptide cyclique.

N'ayant pu obtenir comme ils le désiraient les glycérides des amino-acides, L. BALBIANO et D. TRASCIATTI enregistrèrent, sans plus, cette constatation comme un échec ; et il semble bien qu'ils aient dès lors abandonné leur sujet de travail comme de nature ingrate et stérile. Telle est du moins l'impression qui résulte de la lecture de leurs mémoires, et du fait que dix années se sont écoulées sans voir reprendre le travail.

On sait cependant combien l'échec d'une expérience que l'on croyait aisée, peut être fertile en enseignements, car il révèle souvent des facteurs insoupçonnés, et peut ouvrir des horizons aussi larges qu'inattendus. Il me sembla donc que l'impossibilité d'obtenir des glycérides par union directe de la glycérine et des acides aminés, bien loin de marquer une défaite de la chimie synthétique, pouvait être au contraire fort instructive. Car j'étais moi-même parvenu, il y a plusieurs années déjà, d'une manière indépendante et dans des recherches qui avaient un autre but que le travail actuel, au même résultat négatif en ce qui concerne les glycérides des aminoacides ; mais ma technique, différente de celle des auteurs italiens, m'avait fourni déjà des résultats plus étendus. Il me semblait que l'apparition, *au lieu et place des glycérides* cherchés, non pas seulement d'un anhydride « corné » du glyco-colle, mais d'une *série de polypeptides*, ne devait pas traduire un simple hasard malencontreux, mais bien plutôt une loi de la nature.

1. L. BALBIANO et D. TRASCIATTI. Ueber ein neues Derivat des Glykocolls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 33, 2323, 1900).

2. « Wir haben vergeblich die Wirkung des Glycerins auf Alanin untersucht ; hier tritt scheinbar, unter denselben Bedingungen, keine Aenderung ein. » (*Ber.*, 33, p. 2325).

Telle est la raison pour laquelle je n'ai point jugé superflu de consacrer un temps assez considérable à établir avec certitude la constitution des produits rencontrés, et à rechercher le mécanisme de leur formation.

Mécanisme probable de la synthèse peptidogène : l'éthérisation glycérique. — Examinons donc quel peut être le mécanisme intime des condensations décrites. Il en est un dont l'idée s'impose immédiatement à l'esprit, tant par la fonction chimique des corps en présence, que par les analogies puisées dans les études antérieures sur les dérivés d'acides aminés. C'est précisément l'idée d'une *éthérisation des acides aminés par la glycérine* : le fait qu'aucun chimiste n'a réussi jusqu'à présent à présenter à l'état de liberté des échantillons de glycérides dérivés des acides aminés, n'est pas une objection, bien au contraire.

Supposons en effet pour un instant que les acides α -aminés soient capables de se comporter, en présence de la glycérine, comme des acides organiques simples, non pourvus de la fonction amine, c'est-à-dire de combiner leur fonction acide aux fonctions alcooliques du propanetriol, comme le font les acides gras (synthèse des graisses par M. BERTHELOT). Peu importe d'ailleurs de savoir s'il se formerait des mono-, des di-, ou des triglycérides : l'essentiel est d'avoir un éther de la forme



R représentant un reste de glycéryle, que les deux autres fonctions alcooliques soient elles-mêmes éthérisées, ou soient restées libres.

Demandons-nous quel serait le sort d'un semblable éther, d'un *glycinate de glycéryle*, par exemple, si nous en avions entre les mains un échantillon. Il suffit de nous reporter aux propriétés des éthers éthyliques ou méthyliques des acides aminés, éthers découverts et étudiés par TH. CURTIUS, et dont E. FISCHER a fait par la suite l'universel emploi que l'on sait dans ses remarquables synthèses de polypeptides.

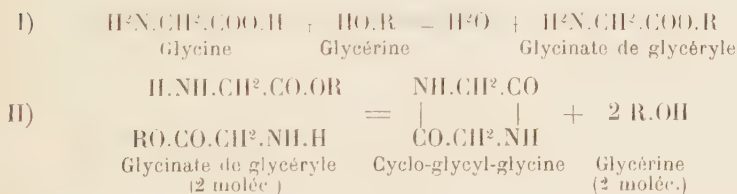
Lorsqu'on prépare, par exemple, le *glycinate d'éthyle*, à peine a-t-on fini de l'isoler de sa solution dans l'éther ordinaire sec, qu'il commence à se détruire en libérant de l'alcool et associant les restes de molécules aminées. Toujours il fournit un mélange, en proportions variables, de cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) et de triglycyl-glycinate d'éthyle (base biurétique de TH. CURTIUS), c'est-à-dire *précisément les deux chaînes que j'ai moi-même obtenues comme témoins de l'action de la glycérine sur le glycocolle*. A la température du laboratoire, la condensation du glycinate d'éthyle débute immédiatement ; elle est aisément reconnaissable en quelques minutes ; elle se parfait en quelques heures,

quelques jours, ou quelques semaines, suivant que l'on n'a pris aucune précaution spéciale, ou que l'on s'est efforcé comme TH. CURTIUS (1) d'exclure la moindre trace d'eau. L'élévation de la température accélère la condensation.

Que deviendra donc le glycinate de glycéryle, dont nous avons supposé la formation, s'il séjourne pendant des heures à la température 170°-175°, puis à la température ordinaire pendant tout le temps nécessaire aux manipulations ? Ou la conception générale de la fonction alcoolique n'est qu'un vain mot, ou le glycinate de glycéryle subira le sort de ses congénères les glycines d'éthyle et de méthyle : il se détruira, avec régénération de l'alcool (la glycérine) et soudure des tronçons d'acides aminés (formation de la cyclo-glycyl-glycine et de la triglycyl-glycine). Si la formation des glycérides a eu lieu au sein du mélange chauffé, elle doit donc se traduire à la fin des manipulations, par la trouvaille des polypeptides qui en restent les témoins.

Bien que je n'aie pas isolé jusqu'ici les glycérides des acides aminés, et *précisément parce qu'on ne les trouve pas dans les produits terminaux de la réaction* (du moins en quantité notable), je considère leur formation comme la préface de la synthèse des polypeptides. *Ma réaction est donc une généralisation de la réaction de TH. CURTIUS*, qui était relative aux éthers éthyliques et méthyliques ; la synthèse des polypeptides par la glycérine relève de la fonction alcoolique de ce corps ; la propriété peptidogène appartient au propanetriol comme elle appartient à l'éthanol et au méthanol, comme elle appartiendrait sans doute à d'autres alcools convenablement choisis.

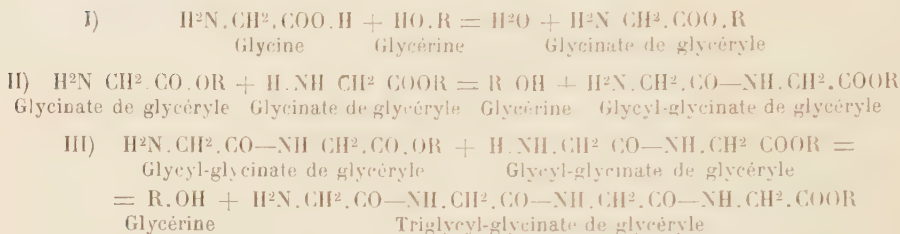
La formation de la *cyclo-glycyl-glycine* (et des autres cyclo-glycyl-glycines homologues qui seront décrites plus loin), s'expliquerait donc par la succession des deux réactions que voici :



Quant à la *triglycyl-glycine*, on conçoit sa formation par l'enchaînement de molécules en série linéaire, avec conservation momentanée d'un groupement glycéryle à l'extrémité de la chaîne, que l'enchaînement

1. TH. CURTIUS Ueber die freiwillige Zersetzung des Glykocollesters (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 1284, 1904).

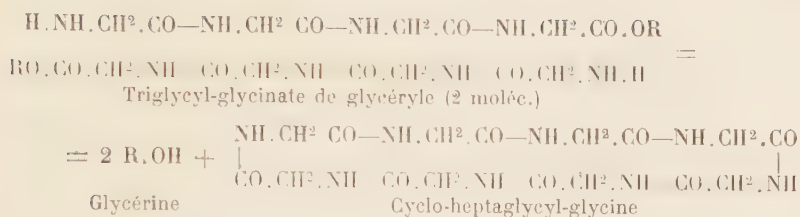
passé par un stade intermédiaire de glycyl-glycinate de glycéryle, ou qu'il se fasse d'un seul coup. Ainsi la succession détaillée des phénomènes serait représentée par la série des réactions suivantes :



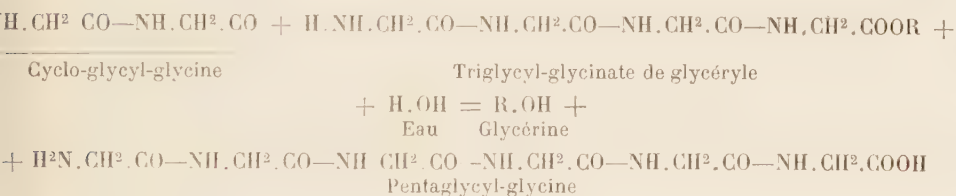
L'aboutissant de cette seconde série de condensations serait donc, non pas la triglycyl-glycine, mais bien son éther glycérique, le *triglycyl-glycinate de glycéryle*, temporairement au moins. Il faudrait pour libérer la triglycyl-glycine elle-même, une saponification ultérieure, absorbant une molécule d'eau pour régénérer la dernière molécule de glycérine, et dont on s'expliquerait aisément l'intervention au cours des manipulations, notamment pendant les fractionnements dans l'eau chaude.

La production, pendant le chauffage au sein de la glycérine, d'un triglycyl-glycinate de glycérine (et non directement de la triglycyl-glycine elle-même) expliquerait certaines observations de détail que j'ai eu l'occasion de faire et qui pourraient être des indices de la présence réelle d'un glycéride. Ainsi, quand on précipite par un excès d'alcool les substances dissoutes au sein de la glycérine refroidie, la triglycyl-glycine ne précipite pas en totalité d'emblée, mais son dépôt se continue pendant plusieurs jours. Ceci pourrait à la rigueur s'expliquer par un simple phénomène physique de sursaturation, mais s'expliquerait tout aussi bien, sinon mieux, par la présence d'un glycéride de la triglycyl-glycine, glycéride dont la saponification n'aurait lieu que progressivement.

La présence momentanée d'un triglycyl-glycinate de glycéryle au sein de la masse glycérinée expliquerait encore à merveille la production ultérieure de la cyclo-polyglycyl-glycine (anhydride corné), qui serait ainsi sans hésitation possible la *cyclo-heptaglycyl-glycine*, formée suivant la réaction très régulière que voici :



Enfin on a vu au chapitre de la *Pentaglycyl-glycine* que la formation secondaire de cette substance avait échoué dans des échantillons pour- tant riches en triglycyl-glycine et en cyclo-glycyl-glycine, mais où l'éli- mination des dernières traces de glycérine avait été exécutée avec un soin particulièrement méticuleux. Je m'étais demandé à ce moment si ces dernières traces de glycérine particulièrement longues à enlever ne proviendraient pas de la décomposition d'un éther glycérique de la tri- glycyl-glycine, glycéride nécessaire à la synthèse de la pentaglycyl- glycine. La réaction véritable comporterait une saponification simul- tanée, c'est-à-dire l'intervention d'une molécule d'eau et la régénéra- tion d'une molécule de glycérine, suivant l'équation complète que voici :



Mais il y a plus. Le fait que dans la formation de la cyclo-glycyl-gly- cine (2.5. diacipipérazine) s'associent les restes de deux molécules, n'a rien de particulièrement intéressant, car il est banal et résulte simple- ment de ce que chaque molécule a deux extrémités. Il en est tout autre- ment en ce qui concerne le tétrapeptide (triglycyl glycine) et en général les chaînes paires supérieures. Pourquoi se forme-t'il un tétrapeptide par union de 4 molécules glyciques avec élimination de 3 molécules de glycérine, plutôt qu'un tripeptide par exemple, par union de 3 molé- cules glyciques avec élimination de 2 molécules de glycérine ? Il y a évidemment ici un facteur particulier, des conditions d'équilibre spé- ciales qui favorisent le couplage des molécules de glycolle. Ne peut-on se demander si ces conditions favorisant le couplage ne se rencontre- raient pas précisément dans le mode même de l'éthérification ? Autre- ment dit, la production de la triglycyl-glycine ne serait-elle pas favori-

sée par la formation préalable d'un *diglycéride* du glycocole, tandis qu'un *monoglycéride* serait suffisant pour assurer la formation de la cyclo-glycyl-glycine ?

On sera fort tenté de donner à la question une réponse affirmative, si l'on se reporte à ce que j'ai dit de la remarquable *Influence de la proportion de glycérine* sur le type de la condensation. La cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) apparaît avec une prépondérance qui touche à l'exclusivité quand la glycérine est en grand excès, *condition favorable à la formation d'un monoglycéride* ; la triglycyl-glycine et ses dérivés pairs prédominent quand la glycérine est en faible quantité, *condition favorable à la formation d'un diglycéride*. Si l'on ne veut voir là qu'une simple coïncidence fortuite, on sera forcé d'avouer qu'elle est bien intéressante.

En résumé, l'hypothèse de l'éthérification glycérique transitoire explique à merveille et dans leurs moindres détails toutes les observations qu'il m'a été donné de recueillir pendant les années qu'a duré ce travail. Je n'ai jamais rien constaté qui puisse me mettre en défiance contre cette interprétation.

On verra tout à l'heure que, transportée dans le domaine des sciences biologiques, cette conception de la *synthèse peptidogène par éthérification glycérique* acquiert une portée qui n'a d'autres limites que celles du monde vivant lui-même.

CHAPITRE XI

INTÉRÊT BIOLOGIQUE DE LA NOUVELLE SYNTHÈSE PEPTIDOGENE

La nouvelle synthèse ne met en jeu que des substances biologiques. — Pour la première fois on se trouve en présence d'une reproduction synthétique des polypeptides par une méthode dont la comparaison avec les phénomènes naturels de l'ordre biologique mérite un examen approfondi.

Dans l'*Introduction* du présent travail, après avoir rendu aux remarquables synthèses de E. FISCHER l'hommage d'une juste admiration, j'ai dû faire remarquer cependant que sa méthode ne pouvait en rien éclairer les biologistes sur le mécanisme intime des phénomènes qu'ils étudient, et cela parce que cette méthode est à la fois indirecte (ou fragmentaire) et artificielle.

« Elle est *indirecte*, ai-je dit ailleurs (1), car elle ne soude pas ensemble une série d'acides aminés préexistants; mais pour *construire* le *n^{ième}* aminoacide à l'extrémité d'une chaîne de rang $(n-1)$, elle est obligée d'apporter *successivement des fragments* qui ne constitueront la molécule de l'acide qu'après un ensemble de réactions. Elle est *artificielle*, car elle met en jeu l'alcool absolu, le gaz chlorhydrique, le brome, le chlorure de thionyle, l'ammoniaque concentrée, bref tout un arsenal de réactifs violents dont ne dispose pas le corps humain.

« La nature procède tout autrement. Notre organisme reçoit une série d'acides aminés séparés les uns des autres par le jeu de la digestion; et ce sont ces aminoacides entiers que doit réassocier notre muqueuse intestinale pour en constituer nos propres matériaux albuminoïdes. Pour éclairer le mécanisme de ce processus *direct et naturel*, il est donc

1. L.-C. MAILLARD, Recherche du mécanisme naturel de formation des albuminoïdes (*Presse médicale*, 20, 144, 1912).

indispensable de trouver une nouvelle synthèse des polypeptides qui réponde aux deux conditions suivantes :

« 1^o Partir, non point d'un chlorure d'acide halogéné ou de quelque autre fragment non biologique, mais bien des acides aminés *eux-mêmes*.

« 2^o Obtenir l'enchaînement peptidique de ces acides aminés sans recourir à l'intervention d'autres substances que celles dont dispose l'organisme. »

Ma méthode de synthèse répond, on le voit, à ce double programme, puisqu'elle prend les acides α -aminés eux-mêmes, isolés ou en mélange, et les associe sans employer autre chose que la glycérine, substance universellement répandue, comme on le sait, chez tous les êtres vivants.

A vrai dire je n'ai préparé jusqu'à présent qu'un nombre assez limité de polypeptides, les moins élevés et les moins compliqués, mais cela résulte d'une question de temps. Aucune des tentatives que j'ai pu faire jusqu'ici n'est restée stérile, et cette circonstance est bien de nature à inspirer confiance dans le développement ultérieur des recherches. D'autre part, on verra que lorsqu'on applique la réaction à un mélange de deux aminoacides, ils n'ont point tendance à former chacun pour son compte le cyclodipeptide homogène correspondant, mais au contraire à s'associer pour donner un cyclodipeptide mixte; et ce fait permet d'espérer qu'en modifiant convenablement les conditions de la réaction, on pourra créer des enchaînements d'aminoacides variés.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons désormais considérer comme acquise la notion fondamentale, à savoir que *la simple action d'un alcool triatomique universellement répandu chez les êtres vivants, la glycérine, suffit à associer les acides aminés suivant le mode même qui préside à leur enchaînement dans les matières protéiques naturelles*.

Le mécanisme de la nouvelle synthèse est comparable à celui des réactions biologiques. — On a vu dans le chapitre précédent les raisons qui m'ont amené à considérer la synthèse actuelle comme résultant de l'éthérification glycérique des aminoacides, qui se comportent en cela comme de simples acides gras. Mais tandis que les glycérides des acides gras sont stables et peuvent être conservés à l'état de graisses, la présence du groupe aminogène confère aux glycérides des acides aminés une fragilité particulière : c'est la raison pour laquelle on ne peut les isoler en nature, et l'on retrouve en leur lieu et place les polypeptides.

La même méthode de traitement direct par la glycérine, qui avait

donné à M. BERTHELOT (1), il y a plus d'un demi-siècle, la célèbre synthèse des graisses, glycérides *stables* des acides *simples*, nous fournit donc aujourd'hui les premiers termes de la famille protéique, par l'intermédiaire des glycérides *instables* des acides *aminés*.

Mais les conditions du phénomène sont-elles comparables à celles de la synthèse protéogène chez les êtres vivants, ou faut-il considérer les deux ordres de réactions comme séparés par une barrière infranchissable? Il semblerait absurde de tenter même une comparaison, si l'on s'arrête aux seules apparences, attendu que la synthèse des polypeptides se passe, dans mes expériences, aux alentours de 170°, et en milieu presque complètement dépourvu d'eau; la synthèse naturelle des albuminoïdes a lieu au contraire à une température beaucoup plus basse, variable suivant les espèces vivantes, mais ne dépassant guère 40°, et dans un milieu toujours abondamment aqueux.

Cependant si l'on examine de près cette double objection, on se convaincra qu'elle n'a pas de valeur : la méthode de synthèse peptidogène que je présente ici ne s'écarte plus du domaine biologique que par de simples différences *purement quantitatives et non plus qualitatives*. La question de température se ramène à une question de vitesse des réactions. J'ai constaté, en effet, maintes fois, que ces réactions, faciles à 170°, s'accroissent notablement à 180°; inversement il est évident que la vitesse décroît à mesure que la température baisse, jusqu'à devenir infiniment lente pour une certaine température limite, que je n'ai pas encore déterminée. Que faudrait-il pour ramener la limite en deçà de 40°? Des accélérateurs de réactions. Or l'économie possède des systèmes accélérateurs, provisoirement désignés sous le nom de diastases.

Nous sommes donc aujourd'hui parfaitement en droit de nous demander si la synthèse biologique des albuminoïdes ne reposerait pas sur l'éthérification glycérique des acides aminés, éthérification favorisée par des systèmes diastasiques. Quelle que soit l'opinion que l'on puisse professer sur la nature intime des « diastases », et même si l'on s'abstient prudemment d'avoir à l'heure actuelle aucune opinion sur ce point, on sait que l'organisme n'est pas seulement le siège de phénomènes diastasiques décomposants (hydrolysants par exemple), mais aussi de phénomènes synthétisants. Bien mieux, les deux ordres de réactions, destructives ou constructives, pourraient être attribués à un

1. M. BERTHELOT. Mémoire sur les combinaisons de la glycérine avec les acides et sur la synthèse des principes immédiats des graisses des animaux (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 3^e s., 41, 216, 1854).

même système, suivant le sens dans lequel les conditions ambiantes l'amèneraient à fonctionner : c'est la réversibilité des diastases, signalée entre autres pour le ferment lipolytique du pancréas, qui pourrait dans certaines conditions fonctionner comme ferment lipothétique.

Pour préciser la discussion, examinons un cas bien défini, et choisissons par exemple les phénomènes qui se passent dans la paroi intestinale de l'homme et des animaux supérieurs, au moment où les matériaux fournis par la digestion traversent cette paroi pour être incorporés à l'organisme. Il est connu que les graisses, glycérides des acides gras, apportées par l'alimentation, sont, au moins en partie, saponifiées par les ferments lipolytiques déversés dans l'intestin, et transformées en glycérine et acides gras (ou savons sodiques). Que la saponification complète des graisses soit indispensable pour leur absorption par la muqueuse intestinale, comme le pensent beaucoup de physiologistes, ou que les graisses non saponifiées puissent pénétrer mécaniquement dans l'épithélium à la faveur de leur division extrême en émulsion très fine, peu importe. La solution de cette question sans cesse renaissante ne nous est pas nécessaire. Un fait est bien acquis : c'est que, ni le sang de la veine porte, ni le contenu des chylifères, ne renferment côte à côte la glycérine libre et les savons (1), bien que ces corps se soient produits (pour une proportion forte ou faible) dans la lumière du tube digestif.

Puisque, après la traversée de la paroi intestinale, les graisses, dont une partie au moins a été saponifiée en glycérine et savons, sont à l'état de glycérides, il faut bien que *la paroi intestinale possède les moyens d'éthérifier par la glycérine le carboxyle des acides gras, malgré la température basse et le milieu aqueux*. Cette remarque, étrangère à toute hypothèse, répond d'un seul coup à la double objection que nous sommes en train d'examiner.

Du moment que l'intestin possède les moyens d'accomplir l'éthérification glycérique des acides gras, on ne voit pas jusqu'ici pourquoi ces mêmes moyens ne lui permettraient pas d'éthérifier aussi le carboxyle des acides aminés. Rien dans les observations faites *in vitro* ne permet de penser que les acides aminés soient plus rebelles à l'éthérification que les acides simples. Nous retrouvons ici encore le parallélisme de nos expériences avec celles de M. BERTHELOT, réalisant directement à haute température la synthèse des graisses que l'organisme sait accomplir vers 40° en milieu aqueux, sans que pour cela les deux processus cessent d'être légitimement comparables.

1. En quantité notable du moins.

La seule différence entre les éthers d'acides gras et les éthers d'acides aminés réside, non pas dans la facilité et les conditions de leur production, mais bien dans la destinée de ces éthers, une fois formés. Stables, les glycérides des acides gras persistent, et sont les graisses de l'économie ; instables, les glycérides des acides aminés se rompent et régénèrent la glycérine, en constituant les molécules albuminoïdes.

Si donc il est vrai que, soit les cellules épithéliales de l'intestin, soit les leucocytes des follicules, disposent d'un système diastasique *lipothétique*, c'est-à-dire *ayant pour fonction d'éthérifier le propanetriol par des carboxyles*, il suffit de ce seul système pour réaliser à la fois la synthèse des graisses et celle des protéiques, suivant qu'il emprunte les carboxyles aux acides gras ou aux acides aminés.

Théorie de la protéogénèse naturelle. — Les considérations physiologiques qui précèdent, jointes aux faits d'ordre chimique qui font l'objet du présent travail, permettent pour la première fois de présenter, non pas une simple hypothèse timide et provisoire, mais bien une véritable *théorie de la protéogénèse naturelle*, établie sur des bases assez solides pour comporter des corollaires et prévoir des conséquences accessibles au contrôle expérimental.

Dans cette théorie, les acides aminés seraient d'abord combinés à la glycérine par le jeu de systèmes éthérifiants analogues et probablement identiques à ceux qui font la synthèse des graisses en éthérifiant la glycérine par des acides gras. La décomposition spontanée des glycérides d'acides aminés aboutirait ensuite à la constitution des enchainements protéiques, tandis que la glycérine serait régénérée.

Ainsi se trouverait éclairé d'un jour inattendu le rôle biologique, assez effacé, et à vrai dire inconnu, de la *glycérine*, qui passerait du rang obscur de banal aliment ternaire à celui d'un agent d'assimilation de premier ordre.

Il faut remarquer, d'ailleurs, que la glycérine intervenant ainsi dans la synthèse protéique serait aussitôt remise en liberté sans déficit, ce qui lui permettrait de servir à de nouvelles condensations, pour se fixer finalement dans la synthèse des graisses.

La glycérine n'est pas le seul alcool de l'économie : il y en a d'autres, et notamment les *sucres*. On verra plus loin les constatations très intéressantes qu'il m'a été donné de faire à leur sujet. En étudiant leur allure vis-à-vis des acides aminés, j'ai vu que, tout au moins lorsque les sucres réducteurs sont en excès, c'est leur fonction aldéhydrique ou cétonique qui réagit d'abord avec les acides aminés : la réaction géné-

rale que j'ai ainsi découverte (1) permet d'espérer une ample moisson de conséquences, notamment sur le terrain biologique. Il est possible d'autre part que, par leurs fonctions alcooliques, les sucres puissent agir dans le même sens que la glycérine, et favoriser, eux aussi, l'enchaînement peptidique des acides aminés; cependant leur intervention ne serait que tout accessoire, et dans les conditions habituelles je serais porté à la considérer comme nulle ou insignifiante vis-à-vis de celle de la glycérine.

Les chaînes polypeptidiques ne sont d'ailleurs pas le seul élément de structure des matières albuminoïdes; sans parler de l'arginine, guanidine complexe dont on connaît l'importance, l'hydrolyse de ces matières fournit souvent des sucres ou des sucres aminés, de nature et de quantité variable suivant la matière traitée, et la coïncidence est vraiment digne de remarque. Ne faudrait-il pas voir précisément dans ces molécules sucrées des témoins du rôle de la fonction alcoolique dans la synthèse albuminoïde chez les êtres vivants?

On vient de voir que ma théorie de la protéogénèse repose sur l'éthérification des acides aminés par les alcools complexes de l'organisme: dans une phase consécutive, la plupart de ces molécules alcooliques sont éliminées, pendant que les tronçons des acides aminés se soudent en chaînes polypeptidiques. Mais si, par suite des détails accessoires de la constitution des divers acides aminés, ou de leur mode de groupement, viennent à être créées, en certaines régions des molécules, des conditions d'équilibre un peu spéciales, ne conçoit-on pas que certaines des molécules alcooliques puissent échapper à l'élimination automatique qui frappe les autres, et se fixer définitivement dans la constitution de la matière?

Ainsi viendraient se grouper et se fondre en un harmonieux ensemble toutes les notions capitales qu'a fournies jusqu'ici l'étude analytique ou synthétique des matières albuminoïdes.

Corollaire de la théorie. Nécessité de la glycérine (ou des graisses) pour l'utilisation digestive des protéiques alimentaires. — Les conceptions que je viens d'exposer sont, ai-je dit, plus qu'une simple hypothèse, et ont la valeur d'une véritable théorie, susceptible par son développement régulier de *prévoir* une série de conséquences accessibles à la vérification expérimentale.

1. L.-C. MAILLARD. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique (*C. R. Acad. Sc.*, 154, 66, 1912). — Réaction générale des acides aminés sur les sucres: ses conséquences biologiques (*C. R. Soc. Biolog.*, 72, 599, 1912).

On trouvera sans doute maintes fois dans l'avenir l'occasion de soumettre ma théorie à de semblables contrôles. Pour le moment j'en signalerai deux, dont la valeur démonstrative me semble toute particulière parce que les études dont il s'agit, contemporaines de mes propres recherches, ont été accomplies d'une manière tout indépendante, sans que chacun des auteurs eût connaissance du travail des autres, et en dehors, par conséquent, de toute idée préconçue. Postérieurs à l'exécution de mes synthèses, ces travaux n'ont pu évidemment influencer sur l'orientation de mes recherches ; antérieurs à la publication de mes résultats, ils n'ont pu être poursuivis par leurs auteurs qu'en pleine liberté d'esprit. La triple convergence que l'on va constater entre les résultats de trois auteurs s'ignorant les uns les autres, partant de points de vue très divers, et travaillant simultanément dans les trois domaines de la physiologie expérimentale, de l'histologie, de la chimie synthétique, ne saurait être considérée comme un simple hasard. On me permettra d'y voir une confirmation de ma théorie, qui prévoit les résultats auxquels *doivent* aboutir les recherches de la physiologie expérimentale et de l'histologie.

Le premier de ces corollaires est la *nécessité de la présence des graisses pour l'utilisation digestive des aliments albuminoïdes*. Si ma théorie est vraie, c'est-à-dire si la création des chaînes peptidiques résulte de l'éthérification des aminoacides par les alcools de l'organisme, la présence d'un alcool est nécessaire à la réunion assimilatrice, au niveau de la muqueuse intestinale, des acides aminés provenant des protéiques alimentaires et qu'a séparés le jeu des ferments digestifs. Les sucres ne peuvent assumer ce rôle indispensable, leur fonction aldéhydrique (ou cétonique) les entraînant en général vers d'autres destinées ; l'organisme ne peut donc trouver l'agent de condensation nécessaire que dans la glycérine. La source pratique de la glycérine se trouvant dans les matières grasses que nous apporte l'alimentation, l'ingestion des graisses *doit* être indispensable à l'utilisation intestinale des albuminoïdes (1).

Nous touchons ici à une question fort controversée dans l'histoire de la physiologie, et qui a donné lieu à des débats fort intéressants. Il s'agit de savoir si les matières albuminoïdes, reconnues indispensables à l'alimentation, sont en même temps suffisantes, c'est-à-dire capables

1. On conçoit qu'un animal n'ingérant plus de graisses peut néanmoins continuer pendant quelque temps à assimiler les albuminoïdes, grâce à une mobilisation des réserves graisseuses contenues dans ses tissus, mais cette restriction de détail ne touche en rien à la loi fondamentale.

à elles seules d'entretenir la vie (1). Cette question se relie à celle de savoir si les albuminoïdes peuvent se transformer en graisses dans l'économie, transformation qui, bien qu'admise par d'éminents physiologistes, n'a jamais été prouvée par personne, tous les arguments apportés en sa faveur ayant été successivement reconnus comme incopérants.

Il y a longtemps déjà que MAGENDIE s'était vu amené à conclure que les matières albuminoïdes à elles seules ne peuvent suffire à l'entretien de la vie. Il administrait de la gélatine à des chiens qui, quelle que fût l'abondance de cette nourriture, dépérissaient tous et mouraient au bout de quelque temps. Mais aux conclusions de MAGENDIE on objecta que la gélatine n'était qu'une matière albuminoïde trop spéciale, incomplète, privée de certains éléments de structure nécessaires aux tissus (la tyrosine par exemple), et qu'on n'avait pas le droit d'étendre les résultats de MAGENDIE aux véritables albumines complètes, alimentaires, à celles de la viande par exemple.

Plusieurs expérimentateurs, dont les plus connus sont PETTENKOFER et VORR, tentèrent donc de reprendre l'expérience de MAGENDIE avec de la viande « dégraissée », c'est-à-dire soumise à une ébullition très prolongée dans l'eau. Bien que l'utilisation de la viande fût ici très mauvaise, on parvenait cependant à entretenir chez les animaux l'équilibre du poids et de l'azote, mais à condition de pousser la dose ingérée jusqu'à des chiffres énormes, 1.500 gr. par jour par exemple pour un chien de 35 kilos. Pour justifier ce gaspillage albuminoïde, on expliquait qu'une faible partie seulement des albumines absorbées au niveau de l'intestin pouvait conserver sa nature albuminoïde et servir à la réparation des protéiques des tissus, la majeure partie des albumines absorbées se transformant en graisse pour subvenir ensuite, par sa combustion, aux besoins énergétiques du corps. Dans cette conception, le fait que l'adjonction de graisses à la nourriture permet de réduire considérablement la ration albuminoïde, traduirait simplement un rôle d'épargne des graisses vis-à-vis des albuminoïdes, que l'organisme peut maintenant consacrer à ses besoins de réparation structurale, sans avoir à les gaspiller comme source énergétique et calorifique. Telle est du moins la notion, basée sur les expériences de PETTENKOFER et VORR et de quelques auteurs, qui est à l'heure actuelle encore très répandue dans les milieux physiologiques, et que l'on peut voir adoptée dans d'excellents ouvrages récents dus aux maîtres les plus autorisés.

1. Avec le concours des diverses matières minérales dont la nécessité est reconnue de tous.

Il faut savoir cependant que le prétendu « dégraissage » de la viande par ébullition prolongée dans l'eau n'est qu'une illusion, et que le tissu retient, même sous forme intraprotoplasmique, une quantité de graisses très suffisante pour annihiler complètement toute signification de l'expérience. Dans ma théorie, on conçoit très bien que l'énorme ration de viande bouillie ne serve qu'à apporter péniblement à l'animal la quantité de glycérides dont il a besoin pour assimiler le minimum d'albuminoïdes nécessaire à son entretien. Quant à l'excès d'albuminoïdes ingérés, il peut, non seulement rester en partie inabsorbé dans le contenu intestinal, mais même être absorbé sous forme d'aminoacides non réassociés en albumines spécifiques et qui augmenteront l'excrétion azotée urinaire sans avoir pour cela jamais pris place dans la constitution protéique des tissus. Bien entendu, la chaîne carbonée de ces aminoacides en excès peut fournir, par sa combustion, à la dépense énergétique de l'animal.

Frappé du caractère illusoire du « dégraissage » de la viande bouillie, F. MAIGNON a repris tout récemment les expériences de MAGENDIE. Bien que ses recherches n'aient été communiquées à la Société de Biologie (1) que le 29 juin 1912, sept mois après la publication de ma théorie (2), elles étaient commencées à une époque (3) où rien n'avait pu influencer leur orientation. F. MAIGNON emploie l'albumine d'œuf, contre laquelle on ne peut élever les mêmes suspicions d'insuffisance constitutionnelle que contre la gélatine. Chez le chien, quelle que soit la dose d'albumine administrée (avec addition de sels minéraux), on ne peut jamais obtenir la fixité du poids : les animaux consomment leurs graisses de réserve, ce qui leur permet une survie assez prolongée (jusqu'à deux mois), mais meurent tous au bout d'un certain temps, dans un état d'amaigrissement extrême. L'état général reste excellent jusqu'aux approches de la mort, malgré un aspect squelettique ; l'animal vit jusqu'à épuisement de ses graisses de réserve : à

1. F. MAIGNON. Rôle des graisses dans l'utilisation de l'albumine alimentaire. Mécanisme de l'action thérapeutique de l'huile de foie de morue et des corps gras médicamenteux en général (*C. R. Soc. Biolog.*, 72, 1054, 29 juin 1912).

2. L.-C. MAILLARD. Condensation des acides aminés en présence de la glycérine : cycloglycylglycines et polypeptides (*C. R. Acad. Sc.*, 153, 1078, 27 nov. 1911). — Synthèse des peptides inférieurs par une méthode nouvelle et directe, voisine des réactions biologiques (*C. R. Soc. Biolog.*, 71, 546, 2 déc. 1911).

3. Voir : *Rapports scientifiques sur les travaux entrepris en 1910 au moyen des subventions de la Caisse des Recherches scientifiques*, p. 242. Melun, Imprim. administrative, 1911.

ce moment il s'affaiblit brusquement et meurt. Le rat, qui ingère spontanément l'albumine d'œuf sous forme de boulettes, meurt au bout d'un temps variable après avoir perdu 40 0/0 de son poids en moyenne, et malgré une consommation d'albumine qui atteint jusqu'à 21 gr. 5 par jour.

En revanche, si l'on confectionne les boulettes *en ajoutant à l'ovalbumine son poids de graisse* (saindoux, graisse de mouton) avec un peu de bicarbonate de sodium (pour éviter l'acidose) et de matières minérales, on entretient le rat en équilibre de poids pendant plusieurs mois.

Enfin si l'on confectionne les boulettes avec 1/4 d'albumine et 3/4 d'*amidon* (plus les sels minéraux), les rats meurent dans un état de maigreur extrême, au bout d'un temps variable (1 à 3 mois, en général 30 à 40 jours), après avoir épuisé leurs réserves de graisses et perdu 45-57 0/0 de leur poids.

Ces expériences « prouvent que l'albumine d'œuf suffit à l'alimentation azotée de l'organisme, mais que les substances protéiques sont inutilisables sans le concours des graisses :... elles plaident aussi en faveur de la non transformation de l'albumine en graisse ».

Les conclusions indépendantes de F. MAIGNON sont, on le voit, la traduction littérale, dans le domaine de la physiologie alimentaire, de ma théorie de la protéogénèse. Il n'est pas jusqu'aux expériences avec l'amidon qui ne viennent corroborer ma théorie : l'amidon ne peut remplacer les graisses pour l'utilisation de l'albumine alimentaire, pas plus que les sucres ne peuvent remplacer la glycérine pour la synthèse des polypeptides.

Corollaire de la théorie. Superposition des figures cytologiques de l'absorption intestinale pour les graisses et les albuminoïdes. — Ce n'est pas seulement l'expérimentation physiologique globale, mais aussi l'observation morphologique la plus fine, qui vient corroborer ma conception de la synthèse albuminoïde dans l'intestin.

Si ma théorie est vraie, si l'enchaînement peptidique des acides aminés repose bien sur l'éthérification glycérique, *la synthèse des graisses et celle des albuminoïdes ne sont au début qu'un seul et même phénomène*, qui ne se dissocie qu'à un stade ultérieur, suivant que les glycérides produits sont stables ou instables. Il est extrêmement probable qu'à ce seul et même phénomène chimique du début ne correspond qu'une unique fonction physiologique, assurée par un seul et même système morphologique. *Les modifications de structure cytologique qu'éprouve l'épithélium intestinal au cours de l'absorption digestive, et que le microscope nous permet de suivre, doivent donc être, pour les graisses et les albuminoïdes,*

identiques ou très semblables, au moins pour une part et surtout au stade de début. Au contraire rien n'autorise à supposer un parallélisme de ce genre en ce qui concerne l'absorption des sucres.

Les figures cytologiques de l'absorption intestinale ont été étudiées déjà à diverses reprises (R. HEIDENHAIN, PANETH, ALTMANN, KREHL, NICOLAS) ; mais les perfectionnements de la technique rendaient utile la revision de ces études, surtout dans une question où il importe de se mettre en garde contre les illusions que pourraient causer des artefacts dus aux réactifs. Ici encore nous avons la bonne fortune de pouvoir nous référer à des recherches toutes récentes, contemporaines de mes propres travaux, et complètement indépendantes, dans lesquelles C. CHAMPY (1) a repris la question à l'aide des techniques les plus modernes et les moins sujettes à caution.

Il a constaté que la cellule à plateau strié de l'épithélium intestinal, qui possède à l'état de jeûne un appareil mitochondrial assez développé, formé de faisceaux de filaments spécialement colorables (chondriocotes) voit dès les premiers stades de l'*absorption des graisses* ses chondriocotes se résoudre en une multitude de petites granulations cytoplasmiques. Cette première constatation faite, C. CHAMPY retrouve les résultats des auteurs qui l'ont précédé : on voit apparaître, *se superposant aux granulations du cytoplasma*, de fines gouttelettes de graisse (faciles à suivre, chez les graisses non saturées, par la réduction en noir de l'acide osmique) ; puis ces gouttelettes, devenant plus grosses, se localisent vers les pôles du noyau, en attendant d'être transportées dans les espaces intercellulaires puis lancées dans le système lymphatique ou prises par les leucocytes. L'auteur pense que les phénomènes cytologiques observés lors de l'absorption des graisses sont dus aux savons ; une solution d'oléate de sodium, introduite dans l'intestin, excite vivement l'activité cellulaire : en même temps que la résolution partielle des chondriocotes en granulations, on observe une division rapide des nucléoles et d'autres signes d'activité du noyau.

En faisant ingérer aux animaux (batraciens) du blanc d'œuf cuit ou cru, on constate au bout de quelques heures, alors que l'*absorption des albuminoïdes* est en pleine activité, « une résolution presque complète des chondriocotes en granulations. On observe bientôt des granulations de taille variable, les plus grosses étant les plus éloignées du plateau strié ; elles ne sont d'ailleurs pas sans analogie avec quelques unes des boules colorables au rouge neutre, sauf qu'elles ne sont jamais aussi

1. C. CHAMPY. Recherches sur l'absorption intestinale et le rôle des mitochondries dans l'absorption et la sécrétion (*Arch. d'anat. microsc.*, 13, 1911 ; et *Thèse Médecine*, Paris, 1911).

grosses que les plus grosses de ces boules. Un peu plus tard le paquet basal de mitochondries est aussi résolu et les vacuoles apparaissent en grand nombre dans la zone sus-nucléaire ». En injectant dans la lumière de l'intestin de divers animaux une solution de peptone de Witte, l'auteur a trouvé en moins d'une heure les chondriocontes complètement résolus en granulations, dans toute la hauteur de la cellule.

« Il ressort de cette série d'expériences, dit C. CHAMPY (1), que les modifications de la cellule intestinale pendant l'absorption, caractérisées par la résolution des chondriocontes, leur transformation en granulations qui grossissent, et la multiplication des nucléoles dans le noyau, sont dues surtout à l'action des savons et des peptones provenant de la digestion des aliments gras et albuminoïdes ».

La phrase ici soulignée l'est par l'auteur lui-même : le fait d'y trouver mentionnés côte à côte les savons et les peptones montre bien que C. CHAMPY, sans avoir eu connaissance de mes travaux et sans se douter de l'identité chimique du mécanisme de synthèse des graisses et des albuminoïdes, a constaté par l'observation directe un parallélisme frappant dans les phénomènes cytologiques de l'absorption de ces deux groupes de substances. Il suffit pour s'en rendre compte de jeter les yeux sur les figures qui accompagnent son mémoire, et notamment de comparer la fig. XXXII, p. 62 (absorption de graisse) à la fig. XXXIV, p. 65 (absorption de peptone de Witte) : on sera frappé de leur ressemblance (2).

1. C. CHAMPY, p. 66.

2. Au cours de ses recherches, C. CHAMPY pense avoir saisi sur le fait la transformation des albuminoïdes en graisses, phénomène dont il admet *a priori* la réalité sur la foi des idées soutenues par beaucoup de physiologistes. Trois animaux, après ingestion de blanc d'œuf cuit, lui ont montré dans l'épithélium intestinal des grains noircis à l'osmium, alors qu'il n'a pu trouver trace de graisses dans le contenu intestinal. Je dois dire que ces observations ne me paraissent pas concluantes : il serait encore possible que l'épithélium eût précisément accaparé pour sa synthèse albuminoïde les traces de graisses qui pouvaient être dans l'intestin, ou même que cette graisse eût été apportée par la circulation, empruntée au corps de l'animal (on voit dans les expériences de F. MAIGNON cette mobilisation des réserves graisseuses). D'ailleurs C. CHAMPY lui-même a soin d'ajouter très impartialement : « J'ai essayé un grand nombre de fois de reproduire l'expérience, et je ne suis arrivé à constater ce phénomène que trois fois ; il est donc inconstant et dépend, non des conditions de l'expérience, qui étaient les mêmes, mais probablement de l'état où se trouvait l'animal mis en expérience ».

Il me semble donc prudent de rester encore sur la réserve en ce qui concerne la réalité de la transformation des albuminoïdes en graisses *chez les animaux supérieurs*.

L'identité du mécanisme de synthèse des albuminoïdes et des graisses se révèle donc jusque sur le terrain cytologique, comme le prévoyait ma théorie de la protéogenèse biologique.

J'ai dit, de plus, que les sucres devaient être laissés à l'écart du groupe Graisses + Albuminoïdes. Or voici ce qu'écrivit à leur sujet C. CHAMPY : « *Sucres.* Chez un Crapaud et un Triton à qui j'avais fait ingérer du glucose en solution assez concentrée, je n'ai pas observé de modifications sensibles de l'appareil mitochondrial. Seulement il m'a semblé que le nombre des vacuoles avait augmenté ».

Enfin l'ingestion des aliments mixtes a donné lieu aux observations les plus curieuses. Chez les Mammifères comme chez les Batraciens on observe toujours les mêmes phénomènes : résolution des chondriocon-tes, apparition de grains colorables par l'alizarine, *puis* de graisse. Chez toutes les espèces l'apparition de graisse est *toujours précédée* de l'apparition des grains protoplasmiques, comme l'avaient déjà vu ALTMANN, NICOLAS, et le remplissage du cytoplasma par ces granulations (non graisseuses) est beaucoup plus abondant que dans le cas de l'absorption des graisses seules. Ces observations me semblent bien signifier que la synthèse des albuminoïdes dans l'épithélium intestinal *précède* celle des graisses. Or, à la lumière de ma théorie de la protéogenèse, nous comprenons aisément qu'il en soit ainsi chez un organisme constitué d'une façon viable. La glycérine nécessaire à la synthèse albuminoïde n'est employée que transitoirement : remise en liberté, elle peut être utilisée *ensuite* à la synthèse des graisses ; tandis que, dès lors qu'elle est fixée dans la synthèse des graisses, elle ne peut plus servir à celle des albuminoïdes.

DEUXIÈME PARTIE

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LES HOMOLOGUES DU GLYCOCOLLE

(Synthèse des cyclo-glycyl-glycines homogènes)

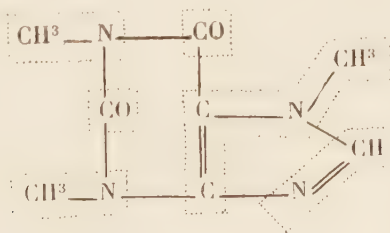
CHAPITRE XII

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LA SARCOSINE SYNTHÈSE DE LA CYCLO-SARCOSYL-SARCOSINE

Préparation de la sarcosine. — La sarcosine a été préparée d'après les brèves indications données par PAULMANN dans le *Handbuch* de BEILSTEIN (1), et d'après lesquelles on doit chauffer pendant quelques jours, avec de la vapeur surchauffée, 1 partie de caféine et 5 parties d'hydrate de baryte.

Dans une capsule de 10 litres de capacité, j'ai placé 2.500 gr. d'hydrate de baryte cristallisé, et 5 litres d'eau distillée; la capsule était disposée sur un réchaud à gaz, de façon à maintenir une température voisine de l'ébullition. Après dissolution de la baryte, on introduit 500 gr. de caféine pure du commerce; puis, tout en maintenant le réchaud allumé, on injecte dans la capsule le courant de vapeur d'eau surchauffée produit par un serpentin en cuivre, monté sur un brûleur et alimenté par la canalisation d'eau du laboratoire. En réglant le débit du serpentin à vapeur et la chauffe directe de la capsule par le réchaud, on arrive à maintenir dans des limites convenables la quantité de liquide accumulée dans la capsule.

On sait que sous l'action prolongée de la baryte, la caféine finit par subir une hydrolyse presque totale, où la sarcosine est cependant respectée, suivant le schéma :



1. *Beilstein's Handbuch der organischen Chemie*, 3^e Aufl., *Ergänzungsbd. I*, p. 656.

1 molécule de caféine fournit ainsi théoriquement 2 molécules de méthylamine, 2 molécules d'acide carbonique, 1 molécule de formiate d'ammonium, et 1 molécule de sarcosine. La baryte présente fixe l'acide carbonique et l'acide formique, tandis qu'il se dégage de l'ammoniaque et de la méthylamine : j'ai donc continué le courant de vapeur surchauffée jusqu'à cessation du dégagement des vapeurs alcalines (3-4 journées de travail).

Sans cesser de chauffer la capsule sur le réchaud, le courant de vapeur est remplacé par un courant de CO^2 (obus carbonique du commerce) jusqu'à disparition de toute réaction alcaline. On laisse alors déposer, on décante, reprend 3 fois par l'eau bouillante le volumineux dépôt de BaCO^3 , filtre et concentre le liquide et les lavages.

La solution doit contenir la sarcosine et du formiate de Ba; on concentre, sur un feu modéré, jusqu'à 1 litre environ. On ajoute alors un assez large excès de H^2SO^4 pour être sûr de fixer tout le baryum et déplacer tout l'acide formique qui pourrait se combiner à la sarcosine; puis on concentre au bain-marie. Les vapeurs qui se dégagent ont une odeur piquante et une réaction acide. On arrête la concentration quand il reste encore environ 250 cc., de peur de trop concentrer le petit excès de H^2SO^4 , qui pourrait attaquer la sarcosine; on remplit de nouveau la capsule d'eau, dont l'évaporation entraîne encore un acide volatil, etc... Cet entraînement par la vapeur d'eau a été renouvelé 4 fois, au bout desquelles on ne reconnaissait plus de dégagement acide, ni à l'odorat, ni au papier de tournesol.

On remet de l'eau une dernière fois, avec un excès de BaCO^3 , et on fait bouillir environ 1/2 heure, pour se débarrasser de H^2SO^4 , puis on concentre à cristallisation, c'est-à-dire *très fortement*. La cristallisation méthodique a donné 3 fractions successives de petits cristaux à saveur sucrée; les deux premières fractions étaient parfaitement blanches et ne laissaient pas de cendres à la calcination. La troisième fraction était légèrement teintée de jaune verdâtre et contenait des traces de baryum : elle a été soumise à une purification.

Ces cristaux de la troisième fraction sont redissous dans l'eau; on ajoute, en excès, une bouillie d'oxyde de cuivre brun fraîchement précipité et parfaitement lavé par centrifugations successives, et l'on porte au bain-marie bouillant pendant 1 heure. Le liquide, filtré pour éliminer l'excès d'oxyde de cuivre, présente une belle coloration d'un bleu intense, due à la combinaison cuivrique de la sarcosine. La solution bleue est concentrée très fortement à chaud, et la combinaison cuivrique de la sarcosine cristallise par refroidissement. Bien essorés, les cristaux sont redissous dans l'eau : cette solution traitée directe-

ment par H_2S donne une solution colloïdale de sulfure de cuivre qui ne laisse précipiter aucun flocon; mais si on a soin de l'additionner d'une assez forte quantité d'alumine (frâchement précipitée par action de la soude sur le sulfate d'aluminium, et parfaitement lavée par centrifugation), la solution donne par H_2S un précipité de sulfure très bien flocculé et facile à séparer. Finalement la solution aqueuse déminéralisée est concentrée très fortement et donne une nouvelle fraction de sarcosine en petits cristaux très blancs, de saveur sucrée, exempts de cendres.

Contrôle de la sarcosine. -- Une combustion de contrôle a été faite sur la troisième fraction des cristaux de sarcosine, après sa purification par l'intermédiaire de la combinaison cuivrique :

I. — Substance : 0 gr. 2854. — CO_2 : 0 gr. 4233. — H_2O : 0 gr. 2169. — C = 40,44 0/0. — H = 8,44 0/0.

Une autre combustion a porté directement sur les cristaux de la première fraction :

II. — Substance : 0 gr. 2638. — CO_2 : 0 gr. 3943. — H_2O : 0 gr. 1957. — C = 40,75 0/0. — H = 8,23 0/0.

Pour l'azote, deux dosages par la méthode de Dumas ont été exécutés, l'un (III) sur la troisième fraction de sarcosine après purification au cuivre, l'autre (IV) sur la première fraction de cristallisation directe :

III. — Substance : 0 gr. 1524. — N_2 dégagé : 20 cc. 9 à $17^{\circ}5$ et 744,4 mm. ($16^{\circ}5$) = 23 mgr. 6013. — N = 15,49 0/0.

IV. — Substance : 0 gr. 1499. — N_2 dégagé : 20 cc. 9 à 16° et 743,5 mm. (18°) = 23 mgr. 6502. — N : 15,78 0/0.

THÉORIE pour $\text{C}^3\text{H}^7\text{NO}^2$		ANALYSE			
		I	II	III	IV
$\text{C}^3 = 36$	40,45	40,44	40,75	—	—
$\text{H}^7 = 7$	7,87	8,44	8,23	—	—
$\text{N} = 14$	15,73	—	—	15,49	15,78
$\text{O}^2 = 32$	—	—	—	—	—
89	100,00				

Les différences sur l'hydrogène (+ 0,57 et + 0,36) sont fortes, mais elles sont du même ordre que celles obtenues dans l'analyse du glyocolle parfaitement pur, et résultent de certains détails de technique.

La pureté de la sarcosine employée est donc contrôlée par l'analyse. Le point de fusion n'a pas été déterminé, étant donné l'impossibilité d'une mesure précise à cause de la décomposition de la sarcosine vers la température de fusion (F. MYLIUS (1))

Action de la glycérine sur la sarcosine. — Dans un petit vase cylindrique on place 40 gr. de sarcosine pure, puis un peu d'eau bouillante pour la dissolution, qui est très facile, enfin 40 gr. de glycérine pure commerciale à 30°B., et on mélange intimement. On place le vase sur la tablette de l'étuve à air, dont on élève progressivement la température, de façon qu'elle atteigne 170° au bout d'une heure environ. On règle alors le feu de manière à maintenir la température dans l'intervalle 170°-175°.

Pour suivre la disparition de la sarcosine, on prélève à diverses reprises, à l'aide d'une baguette, quelques gouttes du mélange glycérimé, que l'on introduit dans un petit tube avec quelques centimètres cubes d'eau et un peu de bouillie d'oxyde de cuivre précipité ; on porte à l'ébullition pendant quelques minutes. Après 3 heures de séjour à 170°-175° on obtient encore une coloration bleue intense, dénotant la présence de sarcosine libre en forte quantité. Après 6 heures de séjour à 170°-175°, la coloration bleue ainsi obtenue est beaucoup plus faible ; enfin, après 9 heures à 170°-175°, la masse a complètement perdu la faculté de dissoudre l'oxyde cuivrique. On arrête alors la chauffe : la sarcosine a disparu.

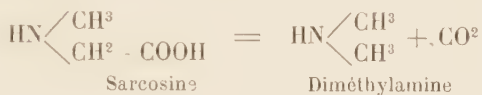
D'autre part, des prises d'essai prélevées à divers moments n'ont jamais offert la moindre réaction du biuret, qui aurait pu révéler la formation d'une substance analogue à la triglycyl-glycine fournie par le glyocolle dans les mêmes circonstances. De même, il ne s'est formé aucune parcelle insoluble pouvant correspondre à la cyclo-polyglycyl-glycine engendrée par la condensation du glyocolle.

Au bout de 1 heure environ à 170°-175°, la masse glycerinée commence à présenter une teinte brune beaucoup plus accentuée que la légère nuance blonde que prend seulement un vase témoin chargé de glycérine et d'eau dans les mêmes proportions, sans sarcosine. Cette

1. F. MYLIUS. Beiträge zur Kenntniss des Sarkosins (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 17, 286, 1884).

teinte brune augmente jusque vers la 4^e heure de chauffe, moment où le départ de l'eau est complet, mais elle n'atteint jamais, même de très loin, la coloration intense obtenue dans les expériences sur le glyco-colle. La matière brune formée dans le cas de la sarcosine est certainement insignifiante au point de vue pondéral, et d'un ordre de grandeur très inférieur à celui de la matière brune fournie par le glyco-colle.

Vers les premiers temps de la chauffe, on perçoit nettement une odeur de diméthylamine, qui traduit évidemment la décomposition d'une petite quantité de sarcosine :



Mais la fraction de la sarcosine ainsi décomposée en diméthylamine et CO² doit être tout à fait minime.

Une formation de base plus importante que celle de la diméthylamine, autant qu'on en puisse juger par l'intensité de l'odeur observée, se traduit par le dégagement d'une odeur alcaloïdique, qui rappelle tout à fait celle d'une pipe à tabac usagée, et qui dérive probablement d'une altération secondaire de la cyclo-sarcosyl-sarcosine formée. La masse glycérinée conserve le lendemain, après son refroidissement, cette forte odeur pyridoïde, en même temps qu'une réaction alcaline au tournesol.

Il est intéressant de noter que cette odeur alcaloïdique disparaît complètement et instantanément lors de l'addition d'éther nécessaire, comme on le verra plus loin, par l'extraction du produit d'anhydri-sation de la sarcosine. En même temps apparaît une odeur aromatique spéciale, rappelant de plus ou moins près celle du noyau des fruits de Rosacées, et qui est due à une substance volatile, car elle accompagne l'éther lors de sa distillation. Cette substance volatile à odeur de noyau ne paraît d'ailleurs présente qu'en très petite quantité, ce qui m'a dissuadé d'en entreprendre l'étude, alors que tous mes efforts se sont portés vers l'isolement et l'étude du produit fondamental de condensation de la sarcosine.

Je signalerai seulement en passant une observation relative à cette substance à odeur de noyau (kirsch, etc...). Ayant abandonné dans le vide sous une cloche en présence de H²SO⁴ l'extraitétheré du mélange glycériné (en vue de la cristallisation du produit fondamental que contient cet extrait étheré), j'ai constaté que l'acide sulfurique présent

sous la cloche se colorait assez fortement en brun et s'imprégnait, à un degré assez remarquable, de l'odeur de noyau. Il serait prématuré de proposer ici des interprétations.

Produit fondamental de condensation de la sarcosine. —

Le produit fondamental de condensation de la sarcosine au sein de la glycérine, n'est pas très facile à isoler, à cause de ses caractères de solubilité, qui dérivent de ceux de la sarcosine elle-même. Ce produit de condensation est extrêmement soluble, même à froid, dans l'eau, dans l'alcool, dans la glycérine, de telle sorte que, non seulement on ne peut songer à le débarrasser par lavages aqueux ou alcooliques, de la glycérine qui l'accompagne, mais que de plus il ne cristallise pas au sein de celle-ci, même à la glacière. Ce n'est donc pas la glycérine que l'on peut enlever du mélange la première, mais au contraire le dérivé de la sarcosine qu'il faut chercher à extraire du sein de la glycérine.

J'y suis parvenu au moyen de l'éther, qui ne dissout d'ailleurs le dérivé de la sarcosine qu'en proportion minime, mais très supérieure néanmoins à la proportion de glycérine entraînée. Dans un flacon de 1 litre on verse la masse glycinée, préalablement réchauffée pour la fluidifier, ainsi que les quelques gouttes de glycérine neuve qui servent à laver le vase à réaction ; on verse alors 5-10 volumes d'éther, on soumet à une bonne agitation, et on laisse reposer. Lorsque l'éther est redevenu bien limpide, ce qui exige au début 5-6 heures, on le décante et on le verse dans un ballon à distillation continue, puis on renouvelle l'épuisement éthéré de la glycérine. Pour extraire la majeure partie du dérivé de la sarcosine, il est nécessaire de renouveler cet épuisement *au moins une trentaine de fois*, ce qui ne laisse pas que d'être assez laborieux ; heureusement la décantation de l'éther se fait moins lentement à mesure que l'opération s'avance, et ne demande plus guère que 1 heure de repos dans les derniers épuisements.

Tout le produit des extractions successives étant réuni dans le ballon à distillation, on y voit se former par le refroidissement de longues aiguilles cristallines au sein d'une masse sirupeuse. On reprend le résidu par un peu d'alcool qui dissout le tout avec une extrême facilité, on verse la solution alcoolique dans un cristallisateur, on chasse l'alcool au bain-marie, et on abandonne le résidu sirupeux dans le vide sur H^2SO^4 . On ne tarde pas à observer la formation de belles aiguilles minces et très longues, qui peuvent traverser diamétralement tout un cristallisateur de 10-15 centimètres. Il peut être avantageux de brasser quelquefois la masse, et de placer la cristallisation à la glacière.

Quand la quantité des cristaux ne paraît plus augmenter, on les fait

égoutter sur un petit entonnoir (maintenu sous une cloche à vide en présence de H^2SO^4 , pour éviter la réhydratation à l'air de la glycérine, qui pourrait causer une redissolution partielle des cristaux). On presse les cristaux entre des doubles de papier à filtre, et on les purifie par recristallisations dans l'alcool chaud : il faut concentrer très fortement, au bain-marie, la solution alcoolique, puis la placer dans le vide sur H^2SO^4 . On est averti des progrès de la purification par la forme des cristaux qui se déposent : cette même substance qui, en présence de la glycérine, constitue de longues aiguilles très minces, prend lorsqu'elle est pure l'aspect de gros cristaux trapus, très bien formés et d'une transparence parfaite. Ainsi, lorsqu'une solution alcoolique des aiguilles de première cristallisation commence à recristalliser, les premiers individus qui se déposent au fond du vase sont les beaux cristaux de forme trapue, et les derniers fournis par la dessiccation progressive des eaux-mères, sont les fines aiguilles. Il y a identité chimique complète (et probablement cristallographique) entre les deux apparences, car si, à une solution alcoolique des gros individus, dont la concentration fournit indéfiniment la forme trapue, on ajoute une trace de glycérine, on obtient désormais la cristallisation de toute la masse sous la forme aiguilles.

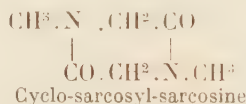
Propriétés du produit de condensation : Cyclo-sarcosyl-sarcosine. — A l'état pur la substance se présente en beaux cristaux parfaitement incolores et transparents, très bien formés. Chauffée rapidement dans un tube, la substance fond en un liquide transparent, donnant un sublimé d'aiguilles blanches, en même temps qu'on perçoit l'odeur pyridoïde déjà observée lors de la préparation. Au bloc Maquenne on trouve le point de fusion à 149° - 150° , température que ne font point varier de nouvelles recristallisations dans l'alcool.

La substance est extrêmement soluble dans l'eau et dans l'alcool, même à froid, légèrement soluble dans l'éther. Elle possède une saveur amère assez intense.

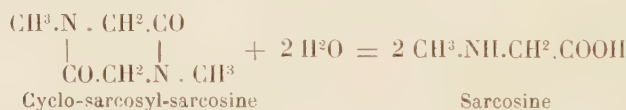
La solution aqueuse ne dissout pas trace d'oxyde cuivrique précipité, même par une ébullition prolongée plusieurs minutes : les fonctions d'acide aminé, que possédait libres la sarcosine, sont donc chez son dérivé, détruites ou bloquées. D'autre part l'expérience suivante a été réalisée : 1 décigramme du corps est placé, avec 50 cc. d'acide sulfurique à 25 0/0, dans un matras à long col, que l'on maintient pendant 4 heures à l'ébullition commençante, en condensant la vapeur d'eau par un entonnoir placé sur le col. On verse alors le liquide dans une capsule spacieuse, on porte à l'ébullition, et on ajoute progressive-

ment du carbonate de baryum pulvérulent, de manière à saturer H^2SO^4 et à parvenir, sans grand excès de BaCO^3 , à la neutralité. On filtre bouillant, on concentre, puis on fait agir sur la bouillie d'oxyde de cuivre, qui se dissout alors très facilement en une belle liqueur bleue, dont la concentration à siccité fournit des cristaux rappelant ceux du sarcosinate de cuivre autrefois préparé.

L'hydrolyse a donc rendu au dérivé de la sarcosine ses fonctions libres d'acide : il est donc certain que ce dérivé est un *anhydride de la sarcosine*, et de plus un *anhydride complet*, c'est-à-dire à chaîne dépourvue d'extrémités libres, à chaîne cyclisée. L'idée qui se présente immédiatement à l'esprit est de le considérer comme l'homologue de la cyclo-glycyl-glycine obtenue en partant du glycolle, c'est-à-dire comme la *cyclo-sarcosyl-sarcosine* $\text{C}^6\text{H}^{10}\text{N}^2\text{O}^2$ (que la nomenclature allemande désignerait du nom de 1.4.diméthyl.2.5.dikétopipérazine) :



On conçoit facilement que l'hydrolyse totale de cette molécule régénère 2 molécules de sarcosine :



Nous allons voir que l'analyse centésimale et la détermination cryoscopique du poids moléculaire confirment cette hypothèse.

Analyse centésimale.

I. — Substance : 0 gr. 2202. — CO^2 : 0 gr. 4096. — H^2O : 0 gr. 1435. — C = 50,73 0/0. — H = 7,22 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 1222. — Méthode Dumas. N^2 dégagé : 20 cc. 8 à 21° et 760,3 mm. (25°) = 23 mgr. 4936. — N = 19,23 0/0.

III. — Substance : 0 gr. 1209. — Méthode Dumas. N^2 dégagé : 20 cc. 7 à 21°5 et 758,8 mm. (23°) = 23 mgr. 2747. — N = 19,25 0/0.

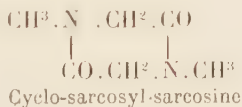
THÉORIE pour $C^6H^{10}N^2O^2$		ANALYSE		
		I	II	III
$C^6 = 72$	50,70	50,73	—	—
$H^{10} = 40$	7,04	7,22	—	—
$N^2 = 28$	49,72	—	49,23	49,25
$O^2 = 32$	—	—	—	—
142	100,00			

Cryoscopie. — Solution aqueuse. Poids de la substance :
 $p = 1$ gr. 4912. — Poids de l'eau : $P = 19$ gr. 9854. — Abaissement
cryoscopique : $c = 0,82$.

$$M = K \frac{100p}{Pc} = 19 \times \frac{400 \times 1,4912}{19,9854 \times 0,82} = 138.$$

CALCULÉ pour $C^6H^{10}N^2O^2$	TROUVÉ
$M = 142$	$M = 138$

Conclusions. — Il est donc bien établi que la réaction fondamentale subie par la sarcosine au sein de la glycérine donne lieu purement et simplement à la formation d'anhydride bimoléculaire, de *cyclo-sarcosyl-sarcosine* (1.4. diméthyl-2.5. dikétopipérazine) :



On n'observe ici aucun indice de la formation de polypeptides supérieurs, et les réactions qui donnent lieu au dégagement d'un peu de diméthylamine et de base à odeur pyridoïde (base pipérazique ?) ne doivent être considérées que comme des altérations secondaires peu importantes au point de vue quantitatif.

Mais si cette méthode est très simple et directe au point de vue de la formation de la cyclo-sarcosyl-sarcosine, je ne saurais la recommander actuellement pour l'obtention pratique du corps, car c'est une opération fastidieuse que d'extraire par l'éther la cyclo-sarcosyl-sarcosine du sein de la glycérine.

Anhydrides de sarcosine de J. Traube et de F. Mylius.

On rencontre dans la littérature deux mémoires où les auteurs décrivent des anhydrides de la sarcosine, et ces deux anhydrides sont catalogués comme un seul et même corps dans le *Handbuch* de BEILSTEIN (1).

Le premier a été obtenu par J. TRAUBE (2) lors du passage d'un courant de chlorure de cyanogène à travers la sarcosine fondue : il se produit un abondant dégagement d'eau, et le résidu, repris par l'eau et débarrassé de HCl, laisse cristalliser par concentration, d'abord de la méthylhydantoïne, puis un corps d'une solubilité extraordinaire dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool et dans l'éther, de saveur amère, qui cristallise en tables incolores à 6 pans, et fond entre 143° et 146°. Le traitement par HCl étendu régénère simplement de la sarcosine, ce qui indique un anhydride de cette substance. Pour isoler le corps à l'état pur en le débarrassant des dernières traces de méthylhydantoïne, et pouvoir l'analyser, J. TRAUBE a dû le faire passer à l'état de chloroplatinate, qui fut obtenu de la solution alcoolique, par addition de chlorure de platine et d'éther, en gros cristaux jaune-rouge.

Les analyses du chloroplatinate concordent avec la formule $C^{12}H^{26}N^4O^6PtCl^6$, et J. TRAUBE attribue à la base libre la formule $C^6H^{12}N^2O^3$, la considérant ainsi comme résultant de l'union de *deux* molécules de sarcosine avec élimination de *une* molécule d'eau. Il fait expressément remarquer que les anhydrides d'acides aminés antérieurement connus (leucinimide, lactimide) résultaient toujours de l'élimination de *une* molécule d'eau pour *chaque* molécule d'acide, mais qu'il n'a pu trouver dans les produits de sa réaction un anhydride analogue, et que son dérivé de la sarcosine appartient à un type différent. Il attribue au chloroplatinate cristallisé dans l'alcool la constitution $(C^6H^{12}N^2O^3)^2 \cdot 2HCl \cdot PtCl^4$, *sans eau de cristallisation* ; « le composé cristallise, partie en grandes tables jaune-rouge à six pans, partie dans les combinaisons les plus variées du système régulier ».

Cependant les conclusions de J. TRAUBE sur la constitution de l'anhydride de sarcosine n'ont pas été admises par F. MYLIUS (3). Ce dernier a constaté d'abord que si la littérature ne contenait pas de données précises sur le point de fusion de la sarcosine, c'est que ce corps subit, au cours même de la fusion, une décomposition. La sarcosine peut être chauffée dans une cornue jusqu'à 200° sans éprouver de changement

1 *Beilstein's Handbuch der organischen Chemie*, 3^e Aufl. 1, 1186.

2 J. TRAUBE, Ueber die Einwirkung des Chloreycans auf Amidosauren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 15, 2110. 1882).

3 F. MYLIUS, Beiträge zur Kenntniss des Sarkosins (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 17, 286, 1884).

appréciable; mais elle commence à fondre lentement entre 210° et 215°, et la liquéfaction est terminée à 220°; en même temps il se dégage de l'eau qui témoigne d'une anhydrisation (sans parler d'une décomposition partielle en diméthylamine et CO²). Par cristallisation du résidu dans l'alcool chaud, on obtient des prismes incolores fondant à 149°-150°, de saveur amère, solubles dans l'eau avec une extraordinaire facilité, auxquels l'analyse centésimale et la densité de vapeur (au-dessus de 350°) assignent la formule C⁶H¹⁰N²O².

L'anhydride de sarcosine résulte donc, d'après F. MYLIUS, de l'union de deux complexes C³H⁵NO, c'est-à-dire de deux molécules de sarcosine dont *chacune* a perdu *une* molécule d'eau; par conséquent F. MYLIUS conclut que J. TRAUBE a commis une erreur en assignant à la base contenue dans son chloroplatinate la formule C⁶H¹²N²O³ et en la considérant comme résultant de l'union de *deux* molécules de sarcosine avec perte d'*une* seule molécule d'eau. L'erreur de J. TRAUBE proviendrait de ce qu'il aurait mal interprété, d'après F. MYLIUS, ses bonnes analyses du chloroplatinate, et pris de l'eau de cristallisation pour de l'eau de constitution. Le chloroplatinate recristallisé *dans l'alcool* aurait bien la formule C¹²H²⁶N⁴O⁶PtCl⁶, mais il faudrait l'écrire, avec deux molécules d'eau de cristallisation :



et non :



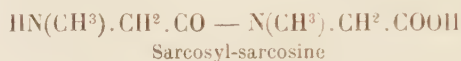
F. MYLIUS a constaté de plus que le chloroplatinate recristallisé *dans l'eau* retient une plus grande quantité d'eau, ce qui lui donne la composition C¹²H³⁰N⁴O⁸PtCl⁶, que F. MYLIUS formule avec 4 molécules d'eau de cristallisation :



Or je crois pouvoir penser personnellement que, si F. MYLIUS a tout à fait raison en ce qui concerne la constitution de son anhydride, il a tort dans son appréciation sur le travail de J. TRAUBE. Il est certain que l'anhydride obtenu par F. MYLIUS lors de la fusion possède bien la constitution qu'il indique : c'est ce même corps que je désigne sous le nom de *cyclo-sarcosyl-sarcosine*, après l'avoir retrouvé comme produit d'action de la glycérine, dont la présence a pour effet d'abaisser la température d'anhydrisation, peut-être par un mécanisme d'éthérification transitoire dont il est question ailleurs. L'anhydride même que J. TRAUBE a eu entre les mains paraît bien, lui aussi, d'après sa description, être

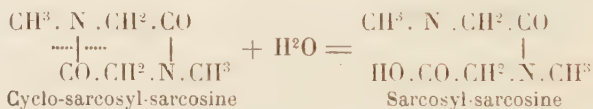
la cyclo-sarcosyl-sarcosine, qui a dû se former dès la fusion de la sarcosine, avant même l'action du chlorure de cyanogène, et qui en raison de l'élimination de l'eau a pu subsister sans ouvrir son cycle, même en présence de HCl formé dans la réaction du chlorure de cyanogène.

Mais nous savons aujourd'hui qu'il faut compter avec l'existence possible de *deux* anhydrides de sarcosine. L'un serait formé, suivant la conception de J. TRAUBE, par union de *deux* molécules de sarcosine avec élimination d'une molécule d'eau, et serait la *sarcosyl-sarcosine* homologue de la glycyl-glycine :



Le second anhydride, formé par *deux* molécules de sarcosine avec perte de *deux* molécules d'eau, ne serait autre que la cyclo-sarcosyl-sarcosine.

Nous avons même des raisons de penser que la cyclo-sarcosyl-sarcosine doit pouvoir ouvrir facilement son cycle, par hydrolyse partielle, pour se transformer en sarcosyl-sarcosine, comme la cyclo-glycyl-glycine s'ouvre en glycyl-glycine :



Mes propres recherches exposées dans un chapitre antérieur, ont établi qu'il suffit, dans le cas de la cyclo-glycyl-glycine, pour cette ouverture de la molécule, des manipulations que comporte la préparation du chloroplatinate, de telle sorte que le composé décrit par TH. CURTIUS et FR. GOEBEL (1) comme chloroplatinate de glycinanhydride (cyclo-glycyl-glycine) est tout simplement identique au chloroplatinate de glycyl-glycine authentique que j'ai préparé à partir de la glycyl-glycine elle-même. Je rappelle que ce composé, cristallisé dans l'alcool aqueux, a pour formule :



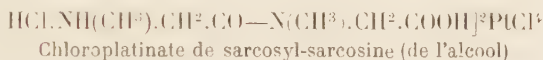
Il est donc très vraisemblable que lorsqu'on ajoute à la solution de cyclo-sarcosyl-sarcosine du chlorure de platine acide, puis qu'on éva-

1. TH. CURTIUS u. FR. GOEBEL. Ueber Glycocolläther (*Journ. f. prakt. Chem.*, 37, 150, 1888).

pore pour recristallisation dans l'eau, on ouvre l'anneau de la molécule, et que l'acide chloroplatinique se combine alors, non pas à la cyclo-sarcosyl-sarcosine, mais bien à la sarcosyl-sarcosine résultant de l'hydratation de celle-ci. Si les choses se passent comme dans le cas des dérivés de la glycine, on doit s'attendre à recueillir un *chloroplatinate de sarcosyl-sarcosine* tel que :



C'est précisément à cette formule que répondent les analyses faites par F. MYLIUS sur le chloroplatinate *cristallisé dans l'eau*. Si le chloroplatinate a été recristallisé dans l'alcool, on obtient des cristaux d'un autre système dont les analyses (J. TRAUBE, F. MYLIUS) concordent avec le sel anhydre :



Je ne puis donc m'associer à F. MYLIUS lorsqu'il reproche à J. TRAUBE d'avoir « pris de l'eau de cristallisation pour de l'eau de constitution », et je croirais plus volontiers que c'est F. MYLIUS qui a pris de l'eau de constitution pour de l'eau de cristallisation. J'ai observé sur le chloroplatinate de glycyl-glycine que, non seulement les $2\text{H}^2\text{O}$ de cristallisation s'échappent très facilement, mais que le corps anhydre commence à perdre, dès 110° - 120° , de l'eau de constitution par décomposition moléculaire. Si pareil phénomène se produit avec le chloroplatinate de sarcosyl-sarcosine, on conçoit sans peine que F. MYLIUS ait obtenu à 110° des pertes qui l'ont induit en erreur sur la teneur en eau de cristallisation.

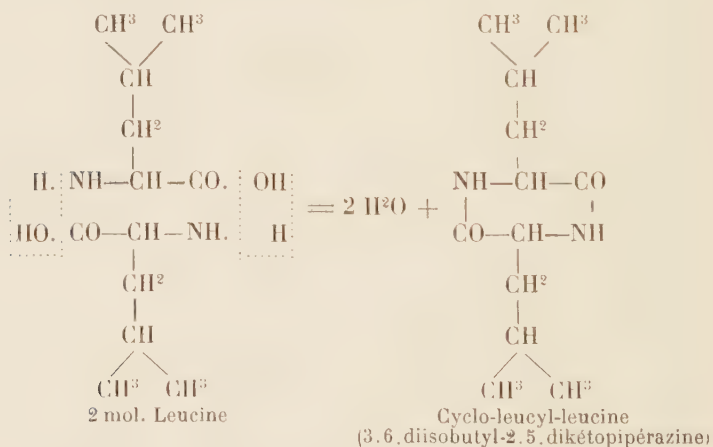
En résumé, s'il est certain que l'anhydride libre de F. MYLIUS était la cyclo-sarcosyl-sarcosine, s'il est probable que l'anhydride libre de J. TRAUBE était aussi la cyclo-sarcosyl sarcosine, il me paraît vraisemblable que leur chloroplatinate n'était autre que celui de la *sarcosyl-sarcosine*, c'est-à-dire d'un corps dont la constitution répond à la conception de J. TRAUBE.

Ainsi s'expliquerait facilement le fait que l'anhydride (complet) de sarcosine, comme le glycineanhydride (complet), dont les molécules possèdent *deux* atomes d'azote identiques, se soient toujours comportés, dans la formation des chloroplatinates, comme s'ils ne possédaient qu'un atome basique. Cette remarque n'a évidemment aucune valeur décisive, étant donnée surtout la faible basicité des fonctions azotées dont il s'agit, mais on peut néanmoins la noter au passage.

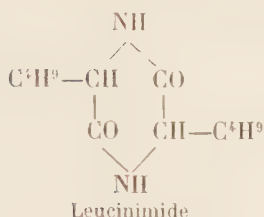
CHAPITRE XIII

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LA LEUCINE SYNTHÈSE DE LA CYCLO-LEUCYL-LEUCINE

Le séjour de la leucine dans la glycérine à 170°-175° détermine, comme dans le cas du glycolle, une anhydrisation double et cyclique, deux molécules de leucine s'unissant réciproquement par leurs groupes CO et NH pour former une *cyclo-leucyl-leucine* :



Le corps ainsi obtenu présente justement la composition $\text{C}^{12}\text{H}^{22}\text{N}^2\text{O}^2$ et la structure qui ont été attribuées à une substance particulière, la « *leucinimide* », trouvée par divers auteurs dans les produits de décomposition hydrolytique des albuminoïdes, et déjà reproduite artificiellement à partir de la leucine :



Les documents publiés sur la leucinimide sont généralement assez sommaires, et parfois peu concordants en apparence ; néanmoins il me semble assez facile de les mettre en harmonie par une étude critique des observations déjà faites et que nous allons passer en revue.

Bien qu'assez volumineuse, cette mise au point bibliographique ne me paraît pas cependant être une digression superflue, parce qu'elle permettra de constater qu'on a trouvé en fait déjà *plusieurs* « leucinimides ». On verra plus loin, en effet, qu'il doit exister plusieurs cyclo-leucyl-leucines et on comprendra aisément leur *mode d'isomérisation* : des considérations exactement parallèles pourront s'appliquer à toutes les cyclo-glycyl-glycines dérivés d'acides aminés autres que le glycocolle, ce qui nous permettra de renvoyer simplement aux développements donnés ici à propos de la leucine, et nous évitera des redites inutiles dans les autres chapitres, qui seront allégés d'autant.

Telle est la raison qui m'a engagé à placer ici le chapitre de la leucine, avant son rang normal d'homologue, afin d'avoir l'histoire des « leucinimides » comme exemple concret du phénomène général d'isomérisation stérique des cyclo-glycyl-glycines.

Documents historiques sur les leucinimides. Leucinimides naturelles. — La découverte d'une substance de ce genre remonte à 1849 ; elle n'est guère postérieure que d'un quart de siècle à la découverte de la leucine elle-même par H. BRACONNOT (1), et résulte des recherches de F. BOPP (2) sur la décomposition des matières albuminoïdes (albumine, caséine, fibrine, matière musculaire) par les acides minéraux concentrés.

F. BOPP dissout 1 partie de matière albuminoïde, desséchée et dégraissée, dans 4 parties d'acide muriatique fort, puis ajoute 3-4 parties

1. H. BRACONNOT. Mémoire sur la conversion des matières animales en nouvelles substances par le moyen de l'acide sulfurique (*Ann. de Chim. et Phys.*, 13, 113, 1820).

2. F. BOPP. Einiges über Albumin, Casein und Fibrin (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 69, 16, 1849).

d'huile de vitriol, et évapore au bain-marie jusqu'à départ de la plus grande partie de l'acide volatil. La masse résiduelle, poisseuse ou sirupeuse, de couleur brun-noir, dans laquelle se forment de petits cristaux, est redissoute dans l'eau chaude, bouillie avec un excès de lait de chaux pour chasser l'ammoniaque, et filtrée sur toile ; du filtrat on précipite par l'acide sulfurique une certaine quantité de chaux maintenue en dissolution par les matières organiques, puis l'excès d'acide sulfurique par le sucre de plomb, et l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré. Le filtrat évaporé à consistance sirupeuse donne au bout de quelques jours une abondante cristallisation : ce sont ces cristaux qui après lavage par l'alcool à 86° fourniront, par un traitement convenable, la tyrosine et la leucine.

Les liquides de lavage par l'alcool à 86° donnent, après un repos de deux mois, de nouveaux cristaux de leucine, encore abondants, et une petite quantité d'une *matière particulière beaucoup plus difficilement soluble dans l'eau* que la leucine. Purifiée, cette substance se présente en aiguilles blanches qui se subliment, comme la leucine, sans résidu, et forment alors d'épais flocons cotonneux ; mais elle se dissout difficilement dans l'eau, presque pas du tout dans l'acide chlorhydrique ou la potasse, facilement dans l'alcool absolu.

La nature de la substance de BOPP resta pendant assez longtemps inconnue. La substance fut cependant, sinon reconnue, du moins revue sous un autre nom, dès 1857, par O. HESSE (1) qui des produits de putréfaction de la levure de bière avait isolé une substance contenant 2,5-4,2 0/0 de soufre et 9,8-9,9 0/0 d'azote, qu'il nommait « pseudoleucine ». La pseudoleucine de O. HESSE n'était évidemment pas une substance définie, comme le montrent la présence et l'irrégularité du soufre ; mais, soumise à la distillation sèche dans un courant de CO_2 , elle donnait un volumineux sublimé d'aiguilles blanches : à cette substance sublimée O. HESSE attribuait la formule $\text{C}^6\text{H}^{11}\text{NO}$ et la dénomination *Leucinsäurenitril*, « nitrile de l'acide leucique ».

E. ERLÉNMEYER et A. SCHÖFFER (2) reprenaient à la même époque l'étude de la substance de BOPP, qu'ils retiraient des produits de décomposition des albuminoïdes (fibrine, albumine, caséine) par l'acide sulfurique étendu de 1 fois 1/2 son volume d'eau. Les échantillons renfermaient du soufre, mais les auteurs les considéraient comme impurs ; la masse principale ne fondait pas, mais se transformait directement en

1. O. HESSE. Beiträge zur Kenntniss der Fäulnisproducte von Bierhefe (*Journ. f. pract. Chem.*, 70, 34, 1857).

2. E. ERLÉNMEYER u. A. SCHÖFFER. (*Z. f. Chem. u. Pharm.*, 1859, 333).

magnifiques flocons blancs très volumineux qui se déposaient en aiguilles à éclat soyeux. Lorsqu'ils eurent connaissance, en 1859, du travail de O. HESSE sur la distillation sèche de la « pseudoleucine » et le « Leucinsaürenitril », ils remarquèrent que ce corps rappelait, tant par l'analyse que par les propriétés, les échantillons les plus purs de « substance de BOPP » préparés par eux. Le nom de « Leucinsaürenitril » leur paraissait seulement très mal choisi, et ils proposaient celui de *Leucinsaüreimid*, « imide de l'acide leucique ».

Bientôt (1860), O. HESSE et H. LIMPRICHT (1) annonçaient que la substance de BOPP, dont ils obtenaient de petites quantités en épuisant par l'alcool bouillant la tyrosine brute séparée des produits de décomposition de la corne par ébullition sulfurique, était *certainement identique* au « Leucinsaürenitril » obtenu par distillation sèche de la « pseudoleucine » dans un courant de CO_2 . D'après leur description, le « *Leucinsaürenitril* » $\text{C}^6\text{H}^{11}\text{NO}$ forme des aiguilles à éclat soyeux, groupées en bouquets qui se subliment sans altération entre 173° et 180° , se dissolvent difficilement dans l'éther, facilement à chaud dans l'alcool fort, à peine dans l'alcool froid, davantage dans l'eau chaude. Les auteurs pensaient que le « nitrile de l'acide leucique » avait pris naissance lors de la putréfaction de la levure, et se trouvait tout préformé au sein du mélange appelé « pseudoleucine », d'où la distillation sèche avait seulement pour effet de l'extraire.

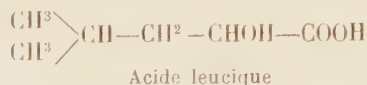
De son côté, E. ERLENMEYER (2) avait poursuivi l'étude de la substance de BOPP, et put dès 1861 confirmer par l'analyse l'identité de cette substance avec le Leucinsaürenitril de O. HESSE. Estimant toutefois que ni cette dénomination, ni même son propre nom de « Leucinsaüreimid » ne répondaient suffisamment à la constitution du corps, il jugeait plus sage de continuer à l'appeler simplement « substance de BOPP ». La fausseté de l'opinion qui considérait le corps comme un nitrile fut d'ailleurs démontrée définitivement dans la suite par E. ERLENMEYER et O. SIGEL (3), qui par union de l'acide cyanhydrique avec l'aldéhyde isoamylique (dérivé de l'alcool amylique de fermentation) préparèrent le véritable nitrile de l'acide leucique (Leucinsaürenitril). C'est une huile incolore, d'odeur particulière, plus légère que l'eau et un peu soluble dans celle-ci, miscible en toutes proportions à l'alcool et à l'éther, qui

1 O. HESSE u. H. LIMPRICHT. Notiz über das sogenannte Leucinsaürenitril (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 116, 201, 1860).

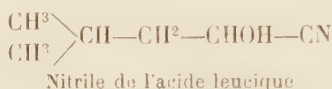
2. E. ERLENMEYER Ueber das sogenannte Leucinsaürenitril und die Aminsäuren der Glycolsäurereihe (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 119, 17, 1861).

3. E. ERLENMEYER u. O. SIGEL. Ueber ein wahres Leucinsaürenitril und die daraus entstehende Leucinsäure (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 7, 1109, 1874).

se décompose en ses constituants lorsqu'on tente de le distiller. L'acide chlorhydrique fumant décompose cette huile en chlorure d'ammonium et acide leucique cristallisé bien reconnaissable :



Aucun doute ne saurait donc exister sur la constitution du véritable nitrile :



et l'on voit combien il diffère de la « substance de BOPP ».

Sur les entrefaites la substance de BOPP avait été qualifiée de *leucinimide* par A. KOHLER (1) qui l'avait reproduite par un procédé de synthèse que nous verrons plus loin, à partir d'une leucine également synthétique. C'est sous ce nom de leucinimide qu'elle a été connue pendant longtemps.

J. L. W. THUDICHUM (2) a repris plus en détail l'étude de la *leucinimide*. Il l'obtenait, soit par épuisement alcoolique des produits de la décomposition sulfurique des albuminoïdes, soit synthétiquement, à l'exemple de A. KOHLER, mais en partant de la leucine d'albuminoïdes. Il a constaté que la leucinimide n'est attaquée ni par l'ammoniaque, ni par la potasse concentrée, même à l'ébullition ; HCl chaud en dissout une trace ; l'acide acétique concentré ou l'acide nitrique dissolvent la leucinimide, qui par évaporation ou neutralisation est récupérée sans altération.

Dans leurs études sur la décomposition des albuminoïdes (albumine d'œuf, caséine, fibrine, albumine végétale de pomme de terre, légumine de pois) par l'action du brome en présence de l'eau, H. HLASIWETZ et J. HABERMANN (3) ont toujours trouvé un peu de *leucinimide* dans les eaux-mères de la leucine. Ces eaux-mères, épaisses, cédaient une partie de leur substance à l'alcool fort, d'où on retirait des cristaux facilement purifiables, blancs, sublimables sous forme laineuse caractéristique, identifiés par l'analyse ($\text{C}^6\text{H}^{41}\text{NO}$) et par toutes les propriétés.

1. A. KOHLER. Ueber eine neue Verwandlung des Leucins (Ann. d. Chem. u. Pharm., 134, 367, 1865).

2. J. L. W. THUDICHUM (J. Chem. Soc., 2^e s., 8, 409, 1870 ; voir Jahresh. üb. Chem., 1870, 800).

3. H. HLASIWETZ u. J. HABERMANN. Ueber die Proteinstoffe. Erste Abhandlung (Ann. d. Chem. u. Pharm., 159, 304, 1871).

En effet la leucinimide ne se rencontre pas seulement dans les produits de décomposition hydrolytique des tissus animaux, mais aussi lorsqu'on part des albuminoïdes végétaux. H. RITTHAUSEN (1) l'a signalée dès 1872 au cours de ses études sur les matières protéiques des graines. « La masse qui constitue le résidu de préparation de la leucine, de la tyrosine, des acides glutamique et aspartique, se laisse diviser par l'alcool à 95° bouillant, en une partie facilement soluble et une autre très difficilement soluble. De la fraction dissoute, se séparent encore, en petite quantité, des corps cristallins, dont l'obtention à l'état pur est assez pénible, et qui pour une part semblent être des corps voisins de la leucine, pour une autre part ont été reconnus comme la *leucinimide* $C^6H^{11}NO$ déjà maintes fois observée, cristallisant en volumineuses aiguilles. Cette substance se sublime, quand on la chauffe, en gros flocons extrêmement volumineux, laineux; elle ne se dissout pas dans l'eau, se dissout facilement dans l'alcool chaud, et recristallise en grande partie après le refroidissement. Elle apparaît chez tous les corps protéiques, mais doit être considérée sans doute comme un produit de décomposition ultérieure de la leucine ».

La première étude approfondie de la *leucinimide* date des travaux de R. COHN. Jusqu'alors les propriétés de la substance n'avaient été décrites que d'une manière un peu sommaire; les traités la passaient généralement sous silence, et dans les auteurs originaux eux-mêmes on ne trouvait pas de caractères d'identification bien nets, en particulier aucun point de fusion. Dans ses recherches sur la décomposition hydrolytique des albuminoïdes par HCl concentré, R. COHN (2) avait isolé une substance cristalline qu'il croyait nouvelle. 1 kilogramme de caséine étant décomposé par une ébullition de 5 heures avec 3 litres de HCl pur concentré fumant, les acides gras (provenant des restes de beurre) sont éliminés par épuisement à l'éther; la plus grande partie de HCl est chassée par évaporations répétées au bain-marie, et le reste est enlevé par l'oxyde cuivreux. Le filtrat bleu foncé est débarrassé de Cu par H^2S , puis concentré progressivement en fractionnant la cristallisation, ce qui élimine la plus grande partie de la tyrosine et de la leucine. Les dernières eaux-mères, assez épaisses, sont mêlées de 6 volu-

1. H. RITTHAUSEN Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Oelsamen. Beiträge zur Physiologie der Samen der Culturgewächse, der Nahrungs- und Futtermittel (Bonn, 252 S., 1872). Voir p. 222.

2. R. COHN. Ueber die Abspaltung eines Pyridinderivates aus Eiweiss durch Kochen mit Salzsäure (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 29, 1785, 1896). — Ueber eine quantitative Eiweisspaltung. I Mittheilung Auffindung eines Pyridinderivates (*Z. physiol. Chem.*, 22, 153, 1896).

mes d'alcool, ce qui précipite un acide de consistance huileuse ; la solution-mère alcoolique, débarrassée encore d'une certaine quantité de leucine par concentration, laisse une dernière solution-mère alcoolique où une addition convenable d'eau fait naître un magma d'aiguilles cristallines. L'épuisement des cristaux de leucine par l'alcool bouillant donne une nouvelle fraction de la même substance : R. COHN en a obtenu au total environ 6 gr. pour 1 kilogramme de caséine.

La substance constitue de longues aiguilles groupées en éventail, qui fondent à 295° corr., et se subliment avec une facilité toute spéciale en formant d'épais flocons laineux. La substance est très difficilement soluble dans l'eau, insoluble dans l'éther, soluble avec une facilité relative dans l'alcool à 96° bouillant, d'où elle recristallise par refroidissement sans pertes sensibles. Elle est insoluble dans les acides et les alcalis dilués, soluble dans l'acide nitrique chaud qui par évaporation l'abandonne inaltérée, enfin soluble, même à froid, dans l'acide sulfurique concentré, où elle supporte même le chauffage à 100° et d'où elle se reprécipite inaltérée par dilution aqueuse.

R. COHN croyait cette substance nouvelle, et la considérait comme un *dérivé pyridique*, parce que la distillation en présence de poudre de zinc dans un courant d'hydrogène avait fourni « deux gouttes » d'une base huileuse à odeur de pyridine. R. COHN admettait la formule C^5H^7NO , avec laquelle les analyses concordaient d'ailleurs assez mal.

Cependant, pour quiconque avait eu connaissance de la *substance de BOPP*, il était difficile de ne pas reconnaître au « dérivé pyridique » de R. COHN une analogie frappante avec celle-ci, en ce qui concerne le mode d'isolement, les caractères de solubilité, la sublimation, etc... H. RITTHAUSEN n'y manqua pas. Nous avons vu qu'il avait lui-même, longtemps auparavant (1872), signalé la leucinimide parmi les produits de décomposition des matières albuminoïdes végétales (1). Ayant encore entre les mains, lors de la publication de R. COHN, un petit échantillon de cette leucinimide, H. RITTHAUSEN (2) en fit répéter l'analyse par PREUSS, analyse dont les résultats semblaient indiquer l'identité des deux corps, et il engagea R. COHN à entreprendre une comparaison étroite des deux produits.

La nouvelle étude de R. COHN (3) fut décisive. Par action du sodium

1. H. RITTHAUSEN. Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Oelsamen. Beiträge zur Physiologie der Samen der Culturgewächse, der Nahrungs und Futtermittel (Bonn, 1872, 252 S.). Voir p. 222.

2. H. RITTHAUSEN. Ueber Leucinimid, ein Spaltungsproduct der Eiweisskörper beim Kochen mit Säuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 29, 2109, 1896).

3. R. COHN. Ueber Entstehung von Basen aus Eiweiss (Naturforscherver-

sur la solution dans l'alcool absolu bouillant, il réussit à réduire son prétendu dérivé pyridique en une base à odeur de tabac. Après addition d'eau à la solution alcoolique et départ de l'alcool par distillation, la base est extraite par l'éther, l'éther est évaporé, et le résidu fortement alcalin est repris par l'acide chlorhydrique étendu. R. COHN obtint de cette solution un chlorhydrate cristallisé dont la teneur trouvée en azote (11,3 0/0) ne concorde pas exactement avec celle (10,3 0/0) qu'exigerait la formule $C^6H^{13}N.HCl$; mais il prépara aussi un chloroplatinate très bien cristallisé dont la teneur en Pt déterminée sur trois fractions différentes (32,3 0/0, 32,5 0/0, 32,4 0/0) concorde très bien avec la théorie (32,20/0) pour la formule $(C^6H^{13}N.HCl)_2PtCl_4$. Si l'extrait éthéré du liquide de réduction est directement purifié par distillation, on voit passer vers 245°-250° la partie principale, qui forme un liquide épais faiblement coloré en jaunâtre, d'odeur fortement basique.

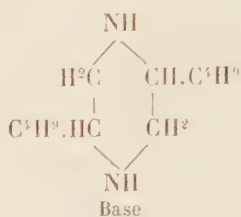
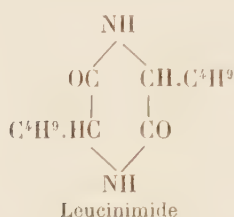
R. COHN voulut alors obtenir un point de comparaison par l'étude d'une leucinimide authentique préparée à partir d'un matériel connu, la leucine extraite des produits d'hydrolyse de la caséine par HCl. Suivant l'ancienne méthode de A. KOHLER (1), R. COHN (2) chauffe cette leucine au bain d'huile dans un courant de HCl sec, jusqu'à 235°-240°, et maintient environ 15 minutes à cette température. Du produit on retire, avec une certaine quantité de leucine inaltérée, une leucinimide qui ressemble très manifestement à la substance trouvée dans l'hydrolyse, mais qui en diffère par certains caractères, par son point de fusion 262° (inférieur de 33°), par une solubilité plus facile dans l'alcool, encore plus difficile dans l'eau, plus facile dans l'éther. Réduite, en solution dans l'alcool absolu, par le sodium, cette leucinimide isomère donne une base forte, distillant entre 220° et 270° sous forme d'un liquide épais, qui d'après son chlorhydrate et son chloroplatinate répond bien à la formule $C^6H^{13}N$, et qui offre une ressemblance frappante avec le produit de réduction de la substance d'hydrolyse. L'allure de cette base engageant R. COHN à lui attribuer un poids moléculaire plus élevé, il a déterminé directement, par cryoscopie dans le phénol, le poids moléculaire de la leucinimide (synthétique à partir de la leucine), et a trouvé 224 alors que la molécule $C^{12}H^{22}N^2O^2$ pèse 226.

sammlung in München, 1899; *Jahresb. Thierchem.*, 29, 6). — R. COHN, Ueber Bildung von Basen aus Eiweiss (*Z. physiol. Chem.*, 29, 283, 1900).

1. A. KOHLER. Ueber eine neue Verwandlung des Leucins (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 134, 367, 1865).

2. R. COHN. Ueber Bildung von Basen aus Eiweiss (*Z. physiol. Chem.*, 29, 283, 1900).

C'est lui qui pour la première fois a proposé les formules actuelles de la leucinimide et de la base qui en dérive par réduction :



R. COHN a ainsi reconnu pour un dérivé pipérazique la base, qui partage avec les corps de cette série la propriété de dissoudre abondamment l'acide urique, et de précipiter même à dilution considérable par le réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium).

Reste à expliquer pourquoi la leucinimide rencontrée parmi les produits d'hydrolyse chlorhydrique de la caséine (F. 295°), et la leucinimide préparée à partir de la leucine déjà isolée (F. 262°), sont des substances isomères et non pas identiques. R. COHN rejette sur les leucines elles-mêmes la responsabilité de cette divergence, et pense qu'il existerait dans la molécule de caséine deux leucines isomères; l'une, présente en petite quantité seulement, serait transformée en leucinimide (F. 295°) dès l'hydrolyse, par la simple ébullition avec HCl aqueux; l'autre, abondante, la leucine ordinaire, ne subirait pas cette anhydri-sation pendant l'hydrolyse, et ne donnerait la leucinimide correspondante (F. 262°) que par chauffage à 230° dans un courant de HCl sec.

Je ne puis, pour ma part, me ranger sans examen à cet opinion de R. COHN, et nous verrons plus loin que la nature de l'isomé-rie entre leucinimides doit être bien plutôt d'ordre stéréochimique. A ce moment je proposerai une interprétation personnelle des observations de R. COHN.

Une autre façon de comprendre la rencontre d'une leucinimide parmi les produits de décomposition hydrolytique des albuminoïdes, est de supposer que *le groupement de la leucinimide existerait tout préformé* au sein de la molécule albuminoïde elle-même, et que ce groupement serait tout simplement mis en liberté au cours de l'hydrolyse. C'est là une des interprétations qui se sont présentées tout naturellement à l'esprit des chimistes.

Il faut signaler ici les observations de S. SALASKIN (1), qui a trouvé

1. S. SALASKIN. Ueber die Bildung des Leucinimids bei der peptischen

une petite quantité de leucinimide parmi les *produits de la digestion pepsique et trypsique* de l'oxyhémoglobine. L'oxyhémoglobine cristallisée du sang de cheval était soumise, en présence de chloroforme et d'éther, à la digestion par le suc gastrique du chien, recueilli suivant la méthode de Pawlow. Le produit de digestion est soumis à une série de concentrations et de précipitations par l'alcool fort : tandis que la majeure partie des autres substances sont successivement précipitées, la leucinimide reste dans les dernières eaux-mères alcooliques ; l'extrait de celles-ci est repris par l'éther acétique, d'où cristallise enfin la leucinimide. Il y a naturellement de grandes pertes, et S. SALASKIN n'a obtenu en produit pur que 0,3 0/0 de l'oxyhémoglobine employée. Trois fractions précipitées de façon différente lui ont fourni des points de fusion de 250°, de 267°, et de 273°-274°, de sorte que l'auteur n'a pu fixer un point de fusion certain pour sa leucinimide de digestion *pepsique*.

La digestion *trypsique* de l'oxyhémoglobine de cheval cristallisée, par le suc pancréatique de chien recueilli suivant la méthode de Pawlow, a également fourni à S. SALASKIN un peu de leucinimide, qu'il isole comme dans le cas de la digestion pepsique, quoique avec plus de difficulté encore et de pertes : rendement 0,1 0/0. Le point de fusion est ici à 295°-296°, et ne varie pas, même après plusieurs recristallisations. L'auteur conclut donc que « suivant que la digestion se poursuit en solution pepsique ou trypsique, il se produit des leucinimides isomères, qui contrairement à la pensée de R. COHN et de H. RITTHAUSEN ne sont pas des produits secondaires de transformation de la leucine primitivement isolée, mais selon toute vraisemblance sont déjà préformées dans la molécule de globine ». Nous reviendrons plus loin sur cette conception.

Dans un travail ultérieur, S. SALASKIN et K. KOWALEVSKY (1) ont de nouveau trouvé dans les produits de digestion *pepsique* de l'oxyhémoglobine de cheval cristallisée, par le suc gastrique du chien (méthode Pawlow), un peu de leucinimide, qui fondait à 263°-267° (*non corrigé*). De plus les auteurs ont réussi également à isoler de la leucinimide dans la digestion pepsique de l'*ovalbumine* cristallisée.

Toutefois on a mis fortement en doute la préexistence du groupement de la leucinimide tout formé d'avance au sein de la molécule albu-

und tryptischen Verdauung des Oxyhämoglobins resp. des Globins (*Z. physiol. Chem.*, 32, 592, 1901).

1. S. SALASKIN et K. KOWALEVSKY, Ueber die Wirkung des reinen Hundemagensaftes auf das Hämoglobin, resp. Globin. Zweite Mitteilung (*Z. physiol. Chem.*, 38, 567, 1903).

minoïde, pour cette raison que la leucinimide n'a pas été trouvée d'une façon régulière et constante dans toutes les hydrolyses protéiques au moyen des acides, et que son apparition dépend peut-être alors de certains détails de technique. Ainsi, tandis que R. COHN a obtenu environ 6 gr. de leucinimide par kilogramme de caséine décomposée au moyen de l'ébullition dans HCl concentré fumant, au contraire E. FISCHER (1), en décomposant la même espèce protéique, la caséine, par le même procédé d'ébullition avec HCl concentré fumant, n'a pas signalé la leucinimide parmi les produits du fractionnement qui a été la première application de sa méthode de séparation des esters d'acides aminés par distillation dans le vide.

Cependant E. ABDERHALDEN (2), après avoir décomposé, toujours par le même procédé de l'ébullition dans HCl fumant, l'oxyhémoglobine cristallisée du sang de cheval, puis avoir fait comme E. FISCHER l'éthérification des acides aminés par un courant de gaz HCl au sein de l'alcool absolu, a trouvé de la leucinimide parfaitement caractérisée, fondant à 296°, et dont la quantité représentait 0,92 0/0 de l'oxyhémoglobine employée. A partir de la caséine hydrolysée, non plus par HCl, mais par H²SO⁴ à 25 0/0, E. ABDERHALDEN (3) a obtenu de même environ 1 0/0 de leucinimide.

Documents historiques sur les leucinimides. Leucinimides synthétiques. — La première synthèse de leucinimide est évidemment celle de O. HESSE (4), qui soumettait à la distillation sèche, dans un courant de CO², la « pseudoleucine » extraite des produits de putréfaction de la levure de bière. Nous avons vu que dans l'opinion de l'auteur, le « nitrile de l'acide leucique » devait prendre naissance au cours même de la putréfaction, et préexister dans la « pseudoleucine » d'où la distillation sèche en présence de CO² servait simplement à l'extraire. D'après ce que nous savons aujourd'hui, il est certain au contraire qu'un tel traitement devait anhydriser en grande partie la leucine présente, et qu'en réalité O. HESSE préparait la leucinimide par chauffage de leucine à haute température dans un courant de CO². Dans cette synthèse fortuite il s'agissait de leucine naturelle.

1. E. FISCHER Ueber Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure (*Z. physiol. Chem.*, 33, 151, 1901).

2. E. ABDERHALDEN. Hydrolyse des kristallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut (*Z. physiol. Chem.*, 37, 484, 1903).

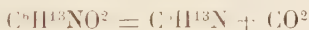
3. E. ABDERHALDEN. Lehrbuch der physiologischen Chemie in dreissig Vorlesungen (Berlin u. Wien, 1906). Voir p. 483, en note.

4. O. HESSE. Beiträge zur Kenntniss der Fäulnisproducte von Bierhefe (*Journ. f. pract. Chem.*, 70, 34, 1857).

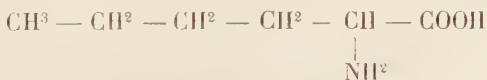
La synthèse de A. KOHLER (1) partait au contraire d'une leucine elle-même synthétique, préparée par la méthode de H. LIMPRICHT, en soumettant à l'ébullition prolongée un mélange d'(iso)valéraldéhyde-ammoniaque, d'acide cyanhydrique et de HCl. La leucine sèche était chauffée au bain d'huile en élevant peu à peu la température jusqu'à 220°-230° pendant que passait un lent courant de gaz HCl sec : elle émettait beaucoup d'eau et se transformait en une masse cristalline brunâtre dont la cristallisation répétée dans l'alcool fournissait des cristaux blancs. Sublimable en gros flocons laineux d'un blanc de neige, quasi insoluble dans l'eau, les alcalis et les acides étendus, soluble sans altération dans l'acide nitrique fort, de composition $C^6H^{11}NO$, le corps était « évidemment identique » à la substance de BOPP, au « Leucinsäurenitril » de O. HESSE. Mais A. KOHLER trouve erroné ce nom de « nitrile » et propose celui de *Leucinimide*. La réaction principale peut se traduire par l'équation :



Une petite partie de la leucine se décompose autrement, et fournit du chlorure d'ammonium, ainsi que du chlorhydrate d'amylamine d'après l'équation :



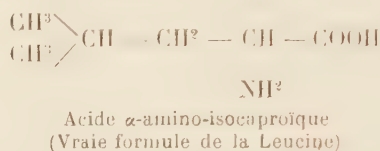
Malgré sa grande ressemblance avec la substance de BOPP, la leucinimide de A. KOHLER a été considérée pendant longtemps comme « évidemment isomère » avec la précédente, et l'on peut lire encore cette affirmation dans le *Beilstein's Handbuch der organischen Chemie* (3^e édition, t. 1, p. 1204, 1893). Elle n'a pas été rectifiée même en 1901 dans le Supplément du même *Handbuch* (Erganzungsband I, p. 664, 1901). Or c'est une erreur, qui provient elle-même d'une erreur longtemps répandue sur la constitution de la leucine naturelle. Celle-ci était considérée comme dérivant de l'acide normal-caproïque, quelle que fût d'ailleurs la position attribuée au groupe aminé, en α ou à l'extrémité de la chaîne :



Acide α -amino-norm. caproïque
(Ancienne formule de la Leucine)

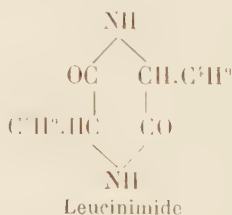
1. A. KOHLER. Ueber eine neue Verwandlung des Leucins (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 134, 367, 1865).

Or l'aldéhyde employé dans la synthèse de LIMPRICHT étant l'aldéhyde *isovalérique*, ne pouvait aboutir qu'à un acide α -amino-*isocaproïque*, c'est-à-dire à une leucine isomère, puis à une leucinimide « évidemment isomère ». Mais il est bien établi aujourd'hui que la leucine naturelle est de constitution *iso*, c'est-à-dire identique à la leucine synthétique de LIMPRICHT et de KOHLER :



La leucinimide de A. KOHLER obtenue à partir de leucine synthétique est donc, non pas isomère, mais bien *identique* à celle que O. HESSE avait préparée à partir de leucine de levure dans un courant de CO^2 , et à celle que J. L. W. THUDICHUM (1) prépara ensuite à partir de la leucine d'albuminoïdes en la chauffant dans un courant de HCl sec, suivant le procédé de A. KOHLER.

Nous avons vu que c'est aussi le procédé de A. KOHLER qui servit à R. COHN (2) pour préparer la leucinimide à partir de la leucine de caséine. A vrai dire la leucinimide synthétique fondait à 262° , tandis que la variété rencontrée directement dans les produits d'hydrolyse fond à 293° , mais il s'agit là d'une isomérie stérique, et non constitutionnelle, sur laquelle nous reviendrons. C'est précisément sur cette leucinimide que R. COHN détermina, par la cryoscopie dans le phénol, le poids moléculaire, ce qui l'amena à fixer la formule $\text{C}^{12}\text{H}^{22}\text{N}^2\text{O}^2$ de la leucinimide, et à lui assigner la structure pipérazique aujourd'hui certaine :



Les gaz CO^2 et HCl secs ne sont pas les seuls agents capables de favo-

1. J. L. W. THUDICHUM, *J. Chem. Soc.*, 2^e s., 8, 409, 1870 ; voir *Jahresb. lib. Chem.*, 1870, 800).

2. R. COHN, Ueber Bildung von Basen aus Eiweiss (*Z. physiol. Chem.*, 29, 283, 1900).

riser le départ de l'eau et l'anhydrisation de la leucine en leucinimide. En faisant agir à 200°, en tube scellé, l'acide benzoïque sur la leucine, A. DESTREM (1) a obtenu, non seulement de la benzoylleucine, homologue de l'acide hippurique, mais aussi un corps insoluble dans l'éther, soluble dans l'alcool chaud qui le laisse cristalliser par refroidissement, et que l'analyse a identifié à la leucinimide. Au contraire, dans l'action à 100° du chlorure de benzoyle sur la leucine, A. DESTREM (2) n'avait pas obtenu de leucinimide, mais bien une substance insoluble dans l'alcool, dont la composition répondait à la formule $C^{12}H^{24}N^2O^3$, c'est-à-dire à un corps formé par l'union de deux molécules de leucine avec perte d'une molécule d'eau : ce corps était-il ce que nous appellerions aujourd'hui une leucyl leucine, la chose est fort possible, mais aucune identification n'a été tentée depuis l'époque, assez reculée déjà, de ces expériences.

La synthèse de la leucinimide (3.6. diisobutyl-2.5. diacipipérazine) a été réalisée par E. FISCHER (3) à l'aide de la méthode des éthers. Le leucinate d'éthyle *racémique* (éther de la leucine synthétique) étant chauffé en tube scellé pendant 24 heures à 180°-190°, le tube est rempli après refroidissement de cristaux jaunâtres, qui deviennent incolores après lavage à l'éther, et représentent 63 0/0 du rendement théorique. Purifiés par cristallisation dans l'alcool bouillant, ils fondent à 271° (corr.). Dans les mêmes conditions, l'éther de la leucine *active* fournit *la même leucinimide*, ce qui révèle une racémisation. La transformation du leucinate d'éthyle en leucinimide se produit rapidement en solution alcoolique en présence du sodium ; après 20 minutes d'ébullition au bain-marie, la moitié environ est transformée. Enfin, un échantillon de leucinate d'éthyle abandonné à la température ordinaire pendant plusieurs mois se remplit de fines aiguilles de leucinimide.

Cette destruction du leucinate d'éthyle avec formation de leucinimide se produit même en présence d'autres éthers. C'est ainsi que lorsqu'on cherche à condenser à température élevée, le leucinate d'éthyle avec le carbéthoxyl-glycyl-glycinate d'éthyle, il se produit bien une quantité notable de carbéthoxyl-glycyl-glycyl-leucinate d'éthyle, mais en même temps une proportion appréciable de leucinimide (E. FISCHER (4)).

1. A. DESTREM. Action de l'acide benzoïque sur la leucine (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 30, 484, 1878).

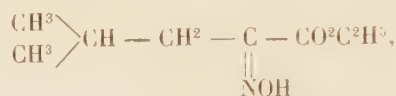
2. A. DESTREM. Action du chlorure de benzoyle sur la leucine (*C. R. Acad. Sc.*, 86, 484, 1878).

3. E. FISCHER. Ueber die Ester der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 433, 1901).

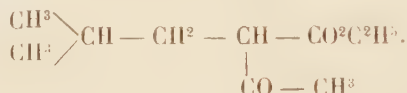
4. E. FISCHER. Ueber einige Derivate des Glykocolls, Alanins und Leucins (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 35, 1095, 1902).

S. SALASKIN (1), répétant la synthèse de E. FISCHER pour se procurer un terme de comparaison authentique, a obtenu une leucinimide qui fondait à 269°-270°.

A leur tour L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN ont observé la formation de leucinimide à partir du leucinate d'éthyle, cet éther étant d'ailleurs préparé par la méthode personnelle des auteurs (2). L'éther éthylique de l'acide α -aminoisobutylacétique s'obtient sans difficultés spéciales, en réduisant au moyen d'amalgame de sodium l'éther-oxime correspondant, à savoir l' α -oximidoisobutylacétate d'éthyle



obtenu lui-même en traitant par le sulfate de nitrosyle en solution sulfurique l' α -isobutylacétylacétate d'éthyle



L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN (3) ont constaté qu'on peut réaliser pendant des mois la conservation de l'éther aminé en ayant soin de l'enfermer dans des tubes de verre bien secs et scellés dans le vide. Lorsqu'on ne prend pas cette précaution, et même lorsqu'on emploie des flacons bouchés à l'émeri, on voit au bout d'un certain temps se former au sein du liquide de petites aiguilles blanches difficilement essorables, insolubles dans le pétrole, solubles dans l'alcool ou dans l'eau bouillante, et cristallisant très bien dans la benzine bouillante additionnée d'un peu d'alcool. En raison de la facilité de sublimation de la substance, les auteurs « n'ont pu noter que son point de fusion instantanée lorsqu'on la projette sur le bloc Maquenne. Dans ces conditions elle fond nettement à 255° corr. ». Il est probable, comme l'ont pensé les

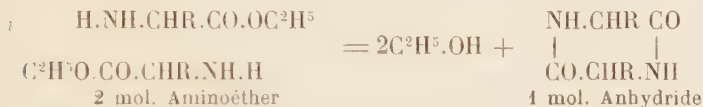
1. S. SALASKIN. Ueber die Bildung des Leucinimids bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Oxyhämoglobins resp. des Globins (*Z. physiol. Chem.*, 32, 592, 1901).

2. L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN. Hydrogénation des éthers α -oximides ; synthèse des homologues du glyocolle et de leurs éthers (*Bull. Soc. chim.*, 3^e s., 31, 1176, 1904).

3. L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN. Nouvelle synthèse de la leucine racémique (*Bull. Soc. chim.*, 3^e s., 31, 1180, 1904). — R. LOCQUIN. Action de l'acide nitreux et de ses dérivés sur les éthers et sur les acides β -cétoniques α -substitués. *Thèse Doct. Sciences*, Paris, 1904. Voir page 401.

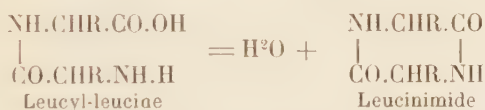
auteurs eux-mêmes, que cet écart de 6° avec le chiffre de E. FISCHER (271°, que j'ai retrouvé moi-même) tient à la façon de prendre les points de fusion, car il serait peu vraisemblable de croire que leur substance ait pu contenir des impuretés.

Dans la condensation du d. l. leucinate d'éthyle en leucinimide, calculée sur la condensation du glycinate d'éthyle en glycinanhydride (TH. CURTIUS), il y a union double de deux molécules leuciques par deux soudures *simultanées* :

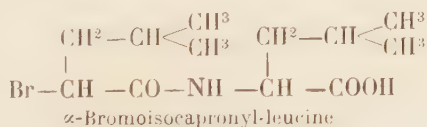


Mais il est bien évident que les deux soudures ne sont pas forcément simultanées, et que la naissance du cycle dikétopipérazique peut avoir lieu aussi par le rapprochement (deuxième soudure) des extrémités d'une chaîne dipeptidique où deux molécules d'acides aminés sont déjà reliées par une première soudure antérieurement constituée.

C'est ainsi que E. FISCHER (1) a constaté qu'en chauffant la *leucyl-leucine* jusqu'à fusion (un peu au-dessus de 270°), il se forme de la *leucinimide* avec élimination d'eau :

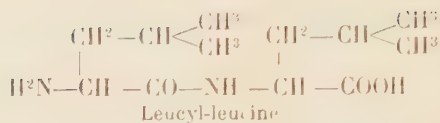


La leucyl-leucine employée dans cette expérience avait été préparée précisément en ouvrant l'anneau pipérazique de la leucinimide elle-même, ouverture difficile qui exige le chauffage à 100° en tube scellé avec HBr au maximum de concentration. Par la suite E. FISCHER (2) préparait la leucyl-leucine initiale en condensant la leucine synthétique, en milieu alcalin, avec le chlorure d' α -bromoisocaproyle, puis chauffant avec de l'ammoniaque concentrée l' α -bromoisocapronyl-leucine :



1. E. FISCHER. Ueber einige Derivate des Glykocolls, Alanins und Leucins (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 35, 1095, 1902).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. II (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 37, 2486, 1904).



La leucyl-leucine de ces deux provenances, préparée à l'aide de matériaux inactifs sur la lumière polarisée, était elle-même inactive, ainsi que la leucinimide qui en dérive : cette leucinimide inactive fondait à 274°.

Dans ses travaux ultérieurs, E. FISCHER (1) a opéré sur des matériaux optiquement actifs. La l-leucine étant copulée en présence de soude avec le chlorure de d. α -bromoisocaproyle, on obtient la d. α -bromoisocapronyl-l-leucine, que le séjour à froid dans l'ammoniaque concentrée transforme en l-leucyl-l-leucine. Celle-ci est mise en suspension dans l'alcool méthylique sec, qu'on sature de HCl gazeux, ce qui donne le chlorhydrate de l-leucyl-l-leucinate de méthyle ; celui-ci étant enfin redissous dans un peu d'alcool méthylique et versé dans l'alcool méthylique saturé d'ammoniac à 0°, le l-leucyl-l-leucinate de méthyle mis en liberté ne tarde pas à subir le sort commun des éthers, et à se condenser en perdant une molécule d'alcool méthylique. En une demi-heure on observe déjà des cristaux d'anhydride, qui est ici le l-leucinanhydride (l-leucinimide) ; après 12 heures on recueille les cristaux, lave à l'eau glacée, et recristallise dans l'alcool bouillant. Le l-leucinanhydride fond un peu plus haut que l'anhydride (leucinimide) inactif antérieurement connu, c'est-à-dire à 277° corr. Dissous dans l'acide acétique glacial, il est lévogyre : $[\alpha]_D^{20} = -42.5$ ou -42.87 .

Enfin E. FISCHER et A. H. KOELKER (2) ont complété la série des divers leucinanhydrides que l'on peut obtenir en fermant la molécule des diverses leucyl-leucines. Il existe en effet 4 leucyl-leucines stéréoisomères :

- | | |
|-----------------------|---------------|
| 1) d-leucyl-l-leucine | } Racémique A |
| 2) l-leucyl-d-leucine | |
| 3) d-leucyl-d-leucine | } Racémique B |
| 4) l-leucyl-l-leucine | |

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XV (Ber. d. d. chem. Ges., 39, 2893, 1906).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XIX E. FISCHER u. A. H. KOELKER. Isomere Leucyl-leucine und deren Anhydride (Ann. d. Chem. u. Pharm., 354, 39, 1907).

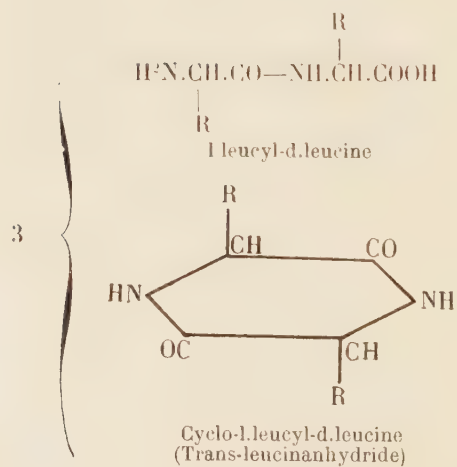
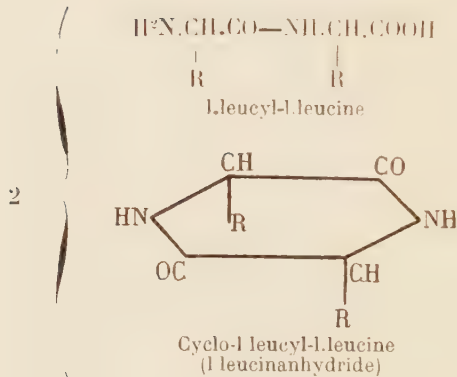
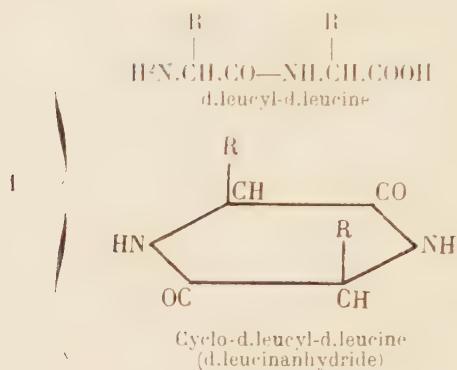
Les 4 leucyl-leucines isomères ont été préparées en copulant, avec la d.leucine ou la l.leucine, l'acide d.x-bromoisocapronique ou l'acide l.x-bromoisocapronique, puis traitant par l'ammoniaque. Chacune des leucyl-leucines est éthérifiée par l'alcool méthylique, puis l'éther est abandonné dans l'alcool méthylique ammoniacal, comme nous venons de le voir pour la l.leucyl-l.leucine, qui se transformait en *l.leucinanhydride*.

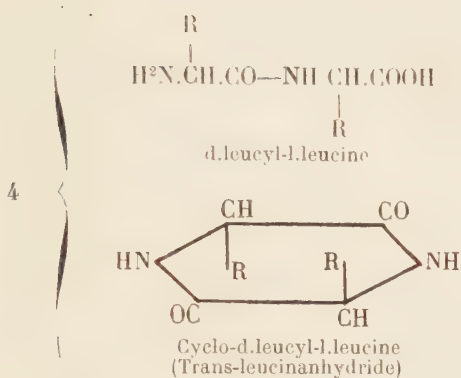
La d.leucyl-d.leucine donne ainsi naissance au *d.leucinanhydride*, qui pour le point de fusion, la solubilité et la forme des cristaux, concorde bien avec son antipode. La concordance est moins bonne pour le pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{20} = +48^{\circ}67$, ou $+48^{\circ}65$, ou $+46^{\circ}02$: les auteurs expliquent ces écarts par la présence d'un peu de racémique à côté du corps principal.

Quant à la d.leucyl-l.leucine et à la l.leucyl-d.leucine, elles aboutissent toutes deux au même corps, le *trans-leucinanhydride* de E. FISCHER et A. H. KOELKER, très difficilement soluble dans l'eau, dont la solution à 5 0/0 dans l'acide acétique glacial ne produit pas la plus petite rotation de la lumière polarisée, et qui fond vers 287° - 289° .

Isomérisie des cyclo-leucyl-leucines. — Les travaux de E. FISCHER et A. H. KOELKER ont apporté la démonstration concrète des idées qu'il était facile de concevoir *a priori* en ce qui concerne le mode d'isomérisie des substances désignées par eux sous le nom de *leucinanhydrides*, qui comprennent les anciennes *leucinimides*, et pour lesquelles la dénomination de *cyclo-leucyl-leucines* me semble préférable.

Représentons-nous dans l'espace la position des groupes alkyles substituants R (dans le cas de la leucine, R signifie $\text{CH}_2 - \text{CH} \begin{smallmatrix} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$) dans la molécule des quatre leucyl-leucines, et la position qu'auront ces groupes R lors de la fermeture de la molécule des leucyl-leucines. Les formules suivantes représentent ces positions dans l'espace :





Si l'on examine les figures cycliques 3 et 4, on reconnaîtra qu'on peut les amener à superposition en les plaçant convenablement. Il n'y a qu'un seul trans-leucinanhydride, la *cyclo-l.leucyl-d.leucine*, qui résulte de la fermeture, soit de la l.leucyl-d.leucine, soit de la d.leucyl-l.leucine. La cyclo-d.leucyl-l.leucine n'a donc pas d'existence individuelle, étant identique à la précédente; entre les deux désignations, on peut convenir que la nomenclature adoptera la première, celle où l'isomère d. est placé à la fin du nom. Cette convention est du même genre que celle par laquelle nous choisissons le nom de cyclo-leucyl-glycine, plutôt que celui de cyclo-glycyl-leucine, qui serait synonyme.

On peut donc au total rencontrer les cyclo-leucyl-leucines (leucinimides des auteurs, leucinanhydrides de E. FISCHER) sous les quatre formes suivantes :

1) *Cyclo-l.leucyl-d.leucine* (trans-leucinanhydride) optiquement inactive par compensation *intra*-moléculaire, F. 287°-289° d'après E. FISCHER et A. H. KOELKER.

2) *Cyclo-d.leucyl-d.leucine* (d.leucinanhydride), dextrogyre, F. 277° d'après E. FISCHER et A. H. KOELKER.

3) *Cyclo-l.leucyl-l.leucine* (l.leucinanhydride), lévogyre, F. 277° d'après E. FISCHER.

4) *Système racémique* des deux antipodes précédents, optiquement inactif par compensation *extra*-moléculaire.

Ceci posé, nous sommes en mesure d'examiner jusqu'à quel point les observations accumulées par les auteurs sur les leucinimides, depuis plus de soixante ans, sont explicables par les conceptions que

je viens d'exposer. Les seuls documents capables de différencier les divers isomères sont les points de fusion, dont voici la liste, à laquelle je joins le point de fusion 271° de la leucinimide obtenue par moi-même (1) en 1911 par action de la glycérine sur la leucine racémique, ainsi qu'on le verra en détail plus loin.

Point de fusion des leucinimides :

1896. R. COHN. Hydrolyse chlorhydrique de caséine	293 ^o
1900. R. COHN. Leucine de caséine, chauffée dans un courant HCl	262 ^o
1901. E. FISCHER. Leucine racémique, éthérification	274 ^o
1. leucine, éthérification	271 ^o
1901. S. SALASKIN. Digestion pepsique d'oxyhémoglobine	250 ^o
hémoglobine	267 ^o
	273 ^o -274 ^o
Digestion trypsique d'oxyhémoglobine	295 ^o -296 ^o
Leucine, éthérification.	269 ^o -270 ^o
1903. S. SALASKIN et K. KOWALEWSKY. Digestion pepsique d'oxyhémoglobine	263 ^o -267 ^o non corr.
1903. E. ABDERHALDEN. Hydrolyse chlorhydrique d'oxyhémoglobine	296 ^o
1904. L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN. Du d.l.leucinate d'éthyle	265 ^o corr. (blac)
1904. E. FISCHER. Fusion de leucyl-leucine racémique	271 ^o
1906. E. FISCHER. Condensation du l.leucyl-l.leucinate de méthyle	277 ^o
1907. E. FISCHER et A. H. KOELKER. Du d.leucyl-d.leucinate de méthyle	277 ^o
Du l.leucyl-d.leucinate de méthyle	287 ^o -289 ^o
Du d.leucyl-l.leucinate de méthyle	287 ^o -289 ^o
1911. L. C. MAILLARD. Leucine racémique chauffée avec glycérine	271 ^o

1. L. C. MAILLARD. Condensation des acides aminés en présence de la glycérine : cycloglycylglycines et polypeptides (*C. R. Acad. Sc.*, 153, 1078, 1911).

On peut faire dans cette liste les groupements que voici :

1^o Nous classerons à part la cyclo-l-leucyl-d.leucine (trans-leucinanhydride de E. FISCHER et A. H. KOELKER), optiquement inactive, qui fond à 287°-289°.

2^o Un autre groupe comprend les produits de E. FISCHER (1901) fondant à 271°, obtenus par étherification éthylique de la leucine racémique (synthèse par l'isovaléraldéhyde), ou de la l-leucine pure (dédoublement du racémique précédent, après formylation). A ce même corps est identique la leucinimide synthétique de S. SALASKIN (1901), qui fond à 1°-2° plus bas (269-270°), mais qui dérive d'une leucine peut-être moins pure, dont la provenance n'est pas indiquée. E. FISCHER (1904) par fusion de la leucyl-leucine racémique, et moi-même (1911) par chauffage de la leucine au sein de la glycérine, avons retrouvé le même corps fondant à 271°. Il faut y joindre certainement la leucinimide de L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN (1904), bien que son point de fusion soit indiqué à 263° corr., mais on sait qu'il avait été pris *au bloc*, et non en petits tubes scellés. Les fractions certainement impures obtenues par S. SALASKIN (1901), F. 250°, F. 267°, F. 273°-274°, puis par S. SALASKIN et K. KOWALESKY (1903), F. 265°-267° *non corrigé*, dans la digestion pepsique de l'oxyhémoglobine, doivent être formées en majorité de la même substance. Enfin l'écart le plus grand serait fourni par la leucinimide synthétique de R. COHN (1900), F. 262°. Cet écart est de 9°, mais il faut remarquer que le produit a été obtenu en chauffant dans un courant de HCl la leucine *extraite des produits d'hydrolyse* chlorhydrique de la caséine, c'est-à-dire une leucine certainement impure, contenant au moins de l'isoleucine et de la valine, peut-être même d'autres amino-acides, capables de prendre part à la formation de cyclo-glycyl-glycines mixtes comme j'en donnerai personnellement un exemple : d'où suspicion sur la pureté de la leucinimide.

Tous ces produits doivent être des échantillons d'une seule et même cyclo-leucyl-leucine fondant authentiquement à 271°. Cette substance, qu'on peut obtenir à partir de la leucine *racémique*, doit évidemment être optiquement inactive. Mais elle ne peut être la cyclo l-leucyl-d.leucine (trans-leucinanhydride de E. FISCHER et A. H. KOELKER) qui fond à 287°-289°. On serait donc amené à la considérer comme le *racémique* formé par l'union de la *cyclo-d.leucyl-d.leucine* (d.leucinanhydride) et de la *cyclo-l.leucyl-l.leucine* (l.leucinanhydride). La compensation optique aurait donc lieu ici, non par voie intramoléculaire, mais par couplage des molécules antipodes.

3^o La *cyclo-l.leucyl-l.leucine* (l. leucinanhydride) fondrait, d'après E. FISCHER (1906), à 277°.

4° La *cyclo-d.leucyl-d.leucine* (d. leucinanhydride) fondrait aussi, suivant E. FISCHER et A. H. KOELKER (1907), à 277°.

3° bis. Il ne reste plus dans notre tableau que les produits obtenus par R. COHN (F. 295°) dans l'hydrolyse chlorhydrique de la caséine, par S. SALASKIN (F. 295°-296°) dans la digestion trypsique de l'oxyhémoglobine, et par E. ABDERHALDEN (F. 296°) dans l'hydrolyse chlorhydrique de l'oxyhémoglobine. Ces trois échantillons appartiennent manifestement à la même substance, que la supériorité de son point de fusion empêche de considérer comme échantillon impur de l'une des précédentes. Quelle peut être cette leucinimide si bien caractérisée ?

Une première interprétation est celle de R. COHN, qui faisait dériver cette leucinimide d'une leucine spéciale, différente de la leucine ordinaire. Aujourd'hui qu'on connaît l'isoleucine, il y aurait lieu d'étudier sous ce rapport les cyclo-isoleucyl-isoleucines, pour confirmer ou pour rejeter définitivement, s'il le faut, l'hypothèse de R. COHN.

Mais je crois pouvoir personnellement en signaler une autre. Au cours de la dégradation hydrolytique des molécules albuminoïdes, il se forme des polypeptides de plus en plus simples : supposons que parmi eux se trouve à un certain moment de la l.leucyl-l.leucine, provenant d'une paire de chaînons l.leucyl préexistant couplés dans l'albuminoïde. La l.leucyl-l.leucine peut, ou bien achever son doublement jusqu'au stade leucine, ou bien fermer sa chaîne, se transformant ainsi en cyclo-l.leucyl-l.leucine. Or, une telle fermeture est aujourd'hui très plausible, maintenant que E. FISCHER (1906) nous a appris qu'on ne peut sécher pour l'analyse un échantillon de l.leucyl-l.leucine, même à 100°, sans l'anhydriser déjà partiellement. De plus, la substance de BOPP et les leucinimides F. 295°-296° ont été retirées de matériaux qui avaient séjourné plus ou moins dans l'alcool bouillant; et si infime qu'on puisse supposer la fraction de l.leucyl-l.leucine éthérifiable dans ces conditions, elle peut aboutir à la formation d'un peu de leucinimide.

La substance de BOPP et les leucinimides naturelles seraient donc en réalité la *cyclo-l.leucyl-l.leucine*, traduisant la *préexistence, au sein de la molécule albuminoïde, de couples (-leucyl-leucyl-)*. Mais alors le point de fusion authentique de la cyclo-l.leucyl-l.leucine, et probablement de son antipode, serait à 295°-296°. Il est bien vrai que E. FISCHER et A. H. KOELKER ont trouvé pour chacun des antipodes 277°; mais ils ont estimé eux-mêmes, d'après l'inconstance du pouvoir rotatoire, que leurs produits devaient contenir du racémique. Le point de fusion s'en trouvait vraisemblablement abaissé, et peut-être faut-il considérer comme seul authentique celui des leucinimides naturelles F. 295°-296°.

En attendant de nouvelles recherches, on peut donc assez bien résumer toute la littérature des leucinimides en ramenant ces corps à 4 variétés :

1° Cyclo-l.leucyl-d.leucine F. 287°-289°

2 ^o Cyclo-l.leucyl-l.leucine	F. 293 ^o -296 ^o	} 277 ^o sur échantillons incomplètement isolés (F. et K.)
3 ^o Cyclo-d.leucyl-d.leucine	(F. 293 ^o -296 ^o)	

4¹⁾ Racémique { Cyclo-l.leucyl-l.leucine } F. 271⁰
 { Cyclo-d.leucyl-d.leucine }

Origine et contrôle de la leucine employée. — La première étude ayant pour but de rechercher seulement l'enchaînement éventuel des molécules de leucine sous l'action de la glycérine, bien plutôt que l'orientation dans l'espace des groupes alkyles substituants, cette étude a été faite au moyen d'un échantillon de leucine racémique de syn-
thèse.

L'échantillon de leucine racémique, de provenance commerciale, se présentait en belles paillettes nacrées d'un blanc pur, rappelant au toucher le caractère onctueux de la cholestérine. Etant donnée son apparence très satisfaisante, cet échantillon n'a été soumis qu'à un seul contrôle analytique, le dosage de l'azote par la méthode Dumas.

Dosage d'azote. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 2015. — Azote dégagé : 18 cc. 8 à 20° et 764,9 mm. (22°) = 21 mgr. 4741. — N = 10,66 0/0.

La teneur théorique en azote de la leucine pure étant 10,69 0/0, le chiffre trouvé 10,66 0/0 établit la bonne qualité de l'échantillon employé. Je dois dire cependant qu'il fondait à 271°-272° corr. (fusion rapide en petit tube scellé au bain d'acide sulfurique et de bisulfate de K), alors que E. FISCHER (4) indique 293°-295° pour la d.l.leucine pure.

Action de la glycérine sur la d.l.leucine. — La réaction de la glycérine vers 175° sur la d.l.leucine se heurte à des difficultés pratiques qui ne se présentaient pas dans le cas du glyocolle ou de la sarcosine. Rien n'était plus aisé que de dissoudre ces derniers corps dans l'eau chaude, d'ajouter la quantité voulue de glycérine, de réaliser un mélange bien homogène, et de laisser ensuite l'eau de dissolu-

1. E. FISCHER.⁴ Spaltung racemischer Aminosäuren in die optisch-aktiven Komponenten. III (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 33, 2370, 1900).

tion s'échapper au cours du chauffage. Mais dans le cas de la leucine, il faut, pour dissoudre l'acide aminé, des volumes énormes d'eau bouillante ; lorsque, après addition de la glycérine, on chasse l'eau par évaporation, la leucine recristallise en larges croûtes à la surface du liquide. Ces cristaux *sortent* même du liquide, dont ils perdent le contact, soit qu'ils grimpent sur les parois du vase, soit qu'ils flottent au-dessus de la glycérine sans être mouillés : la leucine peut ainsi être chauffée pendant des journées à 175° en présence de la glycérine, sans réagir, faute de contact.

Il n'y a donc aucun avantage à faire passer au préalable la leucine en solution aqueuse. J'ai donc essayé de mettre en suspension, directement dans la glycérine concentrée, la leucine réduite en poussière aussi fine que possible. Ici encore l'opération échoue pour les mêmes raisons que précédemment. A mesure que la glycérine atteint une haute température, elle dissout bien, il est vrai, un peu de leucine, et les fines parcelles en suspension disparaissent peu à peu, mais c'est pour aller recristalliser encore à la surface sous forme de larges paillettes qui constituent bientôt une sorte de champignon soulevé grimpant le long des parois, et sans contact avec la glycérine.

Il est inutile d'enfermer la leucine dans un petit sachet en toile de lin, d'amiante, ou de platine, maintenu plongé au sein de la glycérine : la leucine s'échappe encore par solubilisation pour aller former la même croûte inerte au-dessus du liquide.

Après quelques tentatives j'ai pu tourner la difficulté par le tour de main suivant. On prend un gros tube en verre ayant environ 20-25 millimètres de diamètre intérieur, on le ferme à la lampe à son extrémité et on le coupe de telle façon que le tronçon fermé ait environ 45 centimètres de longueur. Le tube étant introduit presque verticalement par l'ouverture supérieure de l'étuve à air, le fond du tube repose sur une tablette de cette étuve, tandis que l'extrémité ouverte dépasse de quelques centimètres l'ouverture de l'étuve. Le tube reçoit 4 gr. de leucine pure, avec 20 gr. de glycérine à 30° B., et on porte l'étuve à 175°. La leucine ne tarde pas à se concréter comme d'habitude à la surface où elle forme un véritable bouchon. Mais alors, il suffit de saisir, de la main droite armée d'un linge, l'extrémité du tube qui dépasse l'étuve, de retirer le tube de l'étuve, et de le frapper de petits coups secs sur la main gauche (également garnie d'un linge) : avec un peu d'habitude, on règle très aisément le choc de façon à renvoyer le bouchon de leucine tout au fond du tube, sous la couche de glycérine, que l'acide aminé devra traverser à nouveau à l'état dissous avant de revenir se concréter à la surface. Le tube est replacé à l'étuve.

On répète de temps en temps cette manœuvre, et l'on ne tarde pas à s'apercevoir que la masse de leucine concrétée à la surface diminue peu à peu ; en même temps la masse glycinée devient plus compacte et l'on voit même s'y former déjà quelques fines aiguilles (qui sont de la leucinimide, comme on le verra tout à l'heure. La masse glycinée prend une teinte rouge brun, beaucoup moins accentuée cependant que la coloration observée dans le cas du glyocolle. On voit en même temps se déposer sur les parties plus élevées du tube, de légères efflorescences blanches formées de fines aiguilles, ce qui résulte de la volatilité bien connue de la leucinimide. Si le tube est assez long, ses parois recueillent ainsi une petite fraction de substance qui sans cela serait perdue ; mais il faut éviter de lui donner une trop grande longueur, ce qui déterminerait la condensation de quelques gouttelettes d'eau qu'il vaut mieux laisser échapper.

Pendant toute la durée du chauffage de la leucine à 175° au sein de la glycérine, on observe un phénomène très intéressant, qui est le dégagement d'une *odeur très nette et intense de cacao torréfié*. Je ne me suis pas livré jusqu'à présent aux recherches nécessaires pour déterminer la nature des substances odorantes ainsi produites ; mais des observations tout à fait parallèles exécutées, comme on le verra, sur d'autres aminoacides qui dégagent, en présence de la glycérine chaude, des odeurs très caractéristiques d'arachide ou de noisette grillées, ont attiré mon attention sur la généralité du phénomène. Il est manifeste que *le chauffage des acides aminés en présence de la glycérine donne naissance à des substances odorantes très semblables* (le défaut seul d'analyse m'empêche de les déclarer *identiques*) *à celles qui se développent lors de la torréfaction des graines oléagineuses*. On remarquera qu'il ne s'agit pas ici d'une simple coïncidence curieuse à observer, mais probablement d'une véritable explication scientifique de la genèse de ces arômes. Les graines renferment en effet tout ce qui est nécessaire à la réaction que je signale *in vitro* : d'une part des acides aminés qui peuvent, soit préexister à l'état libre, soit provenir d'un certain degré d'hydrolyse des matières albuminoïdes au début du chauffage ; d'autre part la glycérine qui peut provenir du dédoublement, dans les mêmes conditions, d'une certaine partie des corps gras de la graine. Dans les derniers stades de la torréfaction se produirait le développement des substances odorantes par réaction mutuelle de la glycérine et des acides aminés.

Les odeurs de graines torréfiées que j'ai pu nettement reconnaître au cours de mon travail sont celles qui dérivent de la leucine (cacao), de la valine (cacaouette), de l'alanine (noisette). Quelle est la nature chimique de ces substances ? S'agit-il de glycérides des aminoacides, de

dérivés de l'anneau pipérazique, ou d'autre chose, je ne saurais le dire pour l'instant.

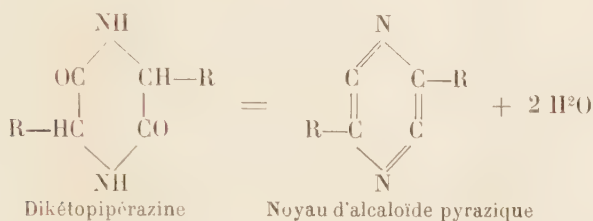
Après que la leucine semble avoir en grande partie disparu, ce qui exige plusieurs heures à 175°, on laisse refroidir le tube, et on voit la masse glycinée se remplir de petites aiguilles extrêmement fines. On plonge pendant quelque temps le tube dans un mélange de glace et de sel, ce qui augmente notablement la consistance du magma glyciné, puis on délaye celui-ci dans l'eau glacée, on jette sur un filtre à la trompe, et on fait rapidement plusieurs lavages à l'eau glacée. Il reste sur le filtre une masse cristalline colorée en brun et tout imprégnée encore de l'odeur de cacao, masse cristalline d'où sera retiré, comme on le verra tout à l'heure, le produit fondamental de condensation de la leucine.

Les eaux de lavage ont entraîné toute la glycérine. Elles sont d'une teinte jaune-verdâtre pâle, avec fluorescence bleue, et possèdent une odeur très intéressante qui, d'une part évoque quoique d'assez loin celle des composés pyridiques, et d'autre part rappelle très nettement l'odeur vireuse que l'on observe en froissant certaines plantes, un ovaire de *Papaver rhoeas* par exemple. Cette remarque fait aussitôt penser à la présence d'un alcaloïde au sein des eaux de lavage. Ces eaux bleussent légèrement le papier de tournesol rouge, font virer très nettement la teinture de tournesol ordinaire et le tournesol d'oreine. Le chlorure de platine en solution alcoolique n'y produit aucune cristallisation, même par évaporation ; en revanche les eaux de lavage donnent des précipités très nets par l'acide picrique, par l'iode en solution iodurée, par l'iodure double de mercure et de potassium (réactifs de Brücke, de Tanret, de Valser), par l'iodure double de cadmium et de potassium, par l'iodure double de bismuth et de potassium (réactif de Dragendorff), par les acides phosphomolybdique, phosphotungstique, silicoduoécitungstique, en solution acide. Ces trois dernières précipitations, en particulier, sont très volumineuses. Aucun de ces précipités ne m'a montré de cristaux reconnaissables au microscope : tous étaient amorphes.

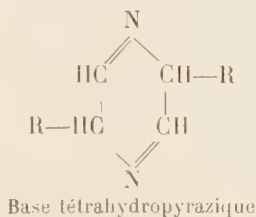
L'alcaloïde ainsi contenu avec la glycérine dans les eaux de lavage passe en solution, par agitation, dans l'éther, qui le cède à son tour à l'eau chlorhydrique. Cette dernière solution fournit les mêmes précipités caractéristiques qu'on obtenait directement sur les eaux glycinées.

Il est donc hors de doute qu'une petite fraction de la leucine chauffée à 175° au sein de la glycérine donne naissance à un alcaloïde. Quelle peut être la nature de cet alcaloïde ? La glycérine prend-elle part, avec la leucine,

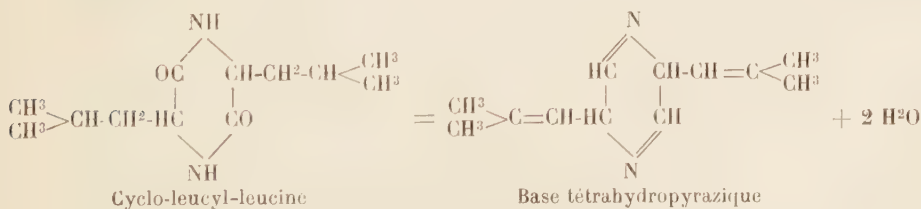
à la constitution de sa molécule ? Ou l'alcaloïde dérive-t'il de la leucinimide d'abord formée ? On voit en effet que la déshydratation directe des dikétopipérazines peut donner naissance à un noyau de base pyrazique :



Il est vrai que ce noyau pyrazique aurait probablement besoin d'hydrogène pour constituer par exemple une base tétrahydropyrazique :



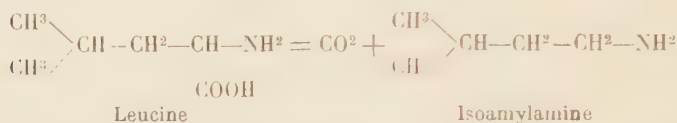
mais cet hydrogène pourrait être emprunté, soit à la glycérine, soit même aux chaînes latérales R de la dikétopipérazine. Par exemple, pour passer *directement* de la leucinimide (cyclo-leucyl-leucine) à un alcaloïde tétrahydropyrazique, il suffirait du départ de 2 molécules d'eau :



Bien entendu, je ne veux nullement affirmer qu'il s'agisse effectivement d'une base hydropyrazique, et je n'expose ici ces considérations que pour indiquer avec quelle facilité les alcaloïdes pourraient se former à partir des acides aminés, par un *simple mécanisme de déshydrata-*

tion. On conçoit tout l'intérêt d'un tel processus pour la physiologie des organismes animaux ou végétaux.

D'autre part j'ai constaté le dégagement de la même base à odeur vireuse caractéristique, par le simple chauffage de la leucine avec de la chaux, ou même seule, et on a coutume d'admettre qu'il se produit alors une simple scission de la molécule de leucine en anhydride carbonique et *isoamylamine* :



Les phénomènes que j'ai observés trouvent-ils tout simplement leur explication dans la seule isoamylamine, ou celle-ci s'accompagne-t-elle en réalité d'alcaloïdes cycliques, bases pyraziques ou hydropyraziques, je ne saurais le dire pour le moment. Je n'ai pas jusqu'ici préparé de matériel basique en quantité suffisante pour son étude, qui m'aurait d'ailleurs entraîné un peu loin de mon travail actuel ; je me réserve d'y revenir, s'il y a lieu, ultérieurement.

Toutefois je puis indiquer dès maintenant qu'ayant eu entre les mains, grâce à l'obligeance de M. ARMAND GAUTIER, un magnifique échantillon de tartrate d'amylamine (iso) parfaitement cristallisé, qui provenait des anciennes recherches de l'éminent chimiste sur les bases d'origine animale et particulièrement sur celles de l'huile de foie de morue (1), j'ai constaté, en libérant l'isoamylamine par la soude ou la potasse, le dégagement d'une odeur nettement différente, et rappelant beaucoup plus celle des amines inférieures. Il serait donc possible que les produits de pyrogénéation de la leucine renfermassent en réalité des alcaloïdes cycliques dus à l'anhydrisation pipérazique de l'acide aminé.

Produit fondamental de condensation de la d.l.leucine. —

Les cristaux restés sur filtre après élimination de la glycérine par lavages aqueux, sont repris par l'alcool bouillant où ils se dissolvent aisément, puis la solution alcoolique est concentrée fortement au bain-marie, de telle façon qu'après cristallisation par refroidissement il ne reste qu'une petite quantité d'eau-mère. Cette eau-mère retient la matière brune, et les cristaux, rapidement lavés à l'alcool, sont pres-

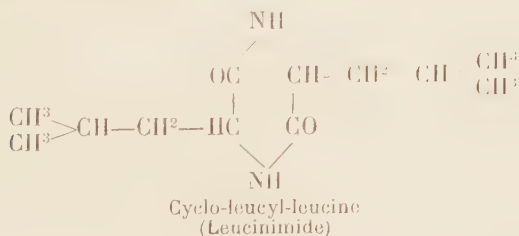
1. A. GAUTIER et L. MOURGUES. Alcaloïdes volatils de l'huile de foie de morue : butylamine, amylamine, hexylamine, dihydrolutidine (*C. R. Acad. Sc.*, 107, 254, 1888). — A. GAUTIER. Les toxines microbiennes et animales. Paris, 1896, voir p. 77.

que blancs. Mais ils peuvent renfermer encore un peu de leucine ayant échappé à la condensation ; pour éliminer ces traces éventuelles de leucine, j'ai suivi l'exemple de R. COHN (1), qui consiste à dissoudre le produit dans un peu d'acide sulfurique concentré et chaud, et à projeter la solution sulfurique dans un grand excès d'eau : la leucinimide est reprécipitée en flocons blancs, tandis que la leucine, s'il y en a, reste dissoute à l'état de sulfate.

Les flocons blancs en suspension dans l'eau sont abandonnés pendant quelques heures, ce qui facilite leur agglomération et leur recueil, puis ils sont rassemblés sur filtre et lavés à l'eau. Repris enfin par l'alcool bouillant, ils m'ont fourni, par refroidissement de la solution alcoolique, de magnifiques aiguilles soyeuses d'un blanc pur et nacré, qui constituent la partie fondamentale des produits de transformation de la d,l-leucine au sein de la glycérine chaude.

La substance, chauffée dans un petit tube, fond, puis se volatilise aisément en déposant sur les parties froides un sublimé blanc volumineux formé de très fines aiguilles enchevêtrées en flocons légers (*lana philosophorum*). Elle est presque insoluble dans l'eau, de même que dans les acides et les alcalis dilués. L'acide sulfurique concentré, légèrement chauffé, la dissout en un liquide incolore qui, versé dans un excès d'eau, laisse précipiter en flocons la substance régénérée sans altération. L'alcool bouillant la dissout aisément, et la laisse recristalliser très abondamment par refroidissement ; elle est insoluble dans l'éther.

Tous ces caractères et notamment l'incapacité de fournir avec les acides ou les alcalis des sels solubles dans l'eau, différencient nettement la substance de la d.l.leucine dont on est parti. Ils concordent tous pour identifier le corps avec la leucinimide décrite par les auteurs, et pour laquelle on admet avec raison une constitution cyclique de dikétopipérazine, que je désigne du nom de *cyclo-leucyl-leucine* :



4. R. CONN. Ueber die Abspaltung eines Pyridinderivates aus Eiweiss durch Kochen mit Salzsäure (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 29, 1785, 1896) — Ueber eine quantitative Eiweisspaltung. I Mittheilung. Auffindung eines Pyridinderivates (*Z. physiol. Chem.*, 22, 453, 1896).

Cette identification a été contrôlée par l'analyse centésimale et par le point de fusion.

Analyse centésimale.

I. — Substance : 0 gr. 2206. — CO_2 : 0 gr. 5154. — H_2O : 0 gr. 1974. — $\text{C} = 63,74$ 0/0. — $\text{H} = 9,93$ 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 1290. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 14 cc. 15 à 16° et 747,0 mm. (15°) = 16 mgr. 0970. — $\text{N} = 12,48$ 0/0.

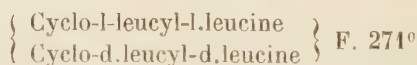
III. — Substance : 0 gr. 1406. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 15 cc. 05 à 17° et 767,9 mm. (20°) = 17 mgr. 5129. — $\text{N} = 12,46$ 0/0.

THÉORIE		ANALYSE		
pour $\text{C}^{12}\text{H}^{22}\text{N}_2\text{O}_2$		I	II	III
$\text{C}^{12} = 144$	63,72	63,74	—	—
$\text{H}^{22} = 22$	9,73	9,93	—	—
$\text{N}_2 = 28$	12,39	—	12,48	12,46
$\text{O}_2 = 32$	—	—	—	—
226	100,00			

Point de fusion. Cyclo-leucyl-leucine racémique. — Le point de fusion a été déterminé en petit tube scellé à parois minces, au bain d'acide sulfurique et de bisulfate de potassium. Plusieurs essais successifs ont été faits, en élevant progressivement la température du bain jusqu'à ce que la fusion d'un nouvel essai introduit dans le bain fût presque instantanée. Point de fusion corrigé : 271° .

On remarquera que ce point de fusion 271° est exactement celui qu'a trouvé E. FISCHER pour la leucinimide obtenue à partir de l'éther éthylique de la leucine racémique. Il y a donc identité complète des deux corps, même au point de vue de l'isomérisie stéréochimique, ce qui n'a rien de surprenant puisque tous deux ont été préparés à partir de la leucine racémique. On sait d'ailleurs que je considère ma méthode comme reposant sur l'éthérification glycérique, et par suite identique dans son mécanisme à celle de TH. CURTIUS, qui repose sur l'éthérification éthylique ou méthylique.

On a vu d'autre part, dans un paragraphe spécial consacré au mode d'*Isomérisie des cyclo-leucyl-leucines*, les raisons pour lesquelles cette variété de leucinimide fondant à 271° me paraît être la paire racémique :



CHAPITRE XIV

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR L'ALANINE. SYNTHÈSE DE LA CYCLO-ALANYL-ALANINE

Origine et contrôle de l'alanine. — L'échantillon d'alanine mis en œuvre provenait de certaines portions du fractionnement des produits d'hydrolyse de diverses matières protéiques, ces portions étant celles dont les éthers éthyliques passent le plus vite à la distillation sous une pression de 20 mm. de mercure.

Ces fractions, intimement mélangées, ne constituaient pas un échantillon d'alanine pure, car l'ébullition dans l'alcool absolu leur enlève, avec des traces de matière colorante jaune, une quantité appréciable de substance blanche cristalline. Même après cette purification par l'alcool absolu, l'échantillon possède une réaction assez fortement acide au papier de tournesol, et une saveur acide assez accentuée pour masquer la saveur sucrée de l'alanine. Pour évaluer le coefficient d'impureté du produit, il a été fait un dosage d'azote par la méthode Dumas.

Dosage d'azote dans l'échantillon impur. — Substance : 0 gr. 1202. — Azote dégagé : 15 cc. 15 à 16° et 755,9 mm. (18°) = 17 mgr. 4363. — $N = 14,51$ 0/0.

L'échantillon ne contient donc que 14,51 0/0 d'azote, alors que l'alanine pure en contient 15,73 0/0 : la différence est suffisante pour comporter la souillure de l'alanine par une proportion notable d'homologues supérieurs. Si l'on suppose, par exemple, que l'impureté soit de la valine ($N = 11,96$ 0/0), il est facile de calculer quelle doit être la proportion x 0/0 d'alanine pure dans le mélange :

$$15,73 x + 11,96 (100 - x) = 14,51 \times 100.$$
$$x = 67,6 \text{ 0/0}$$

L'échantillon étudié contenait donc au moins les deux tiers de son poids d'alanine pure ; mais peut-être pas davantage : il n'a pas été utilisé directement, et n'a été considéré que comme un point de départ pour la préparation de l'alanine pure.

Mis en suspension dans l'alcool absolu, l'échantillon brut est éthérifié par saturation de gaz chlorhydrique sec, puis la masse est évaporée à siccité au bain-marie à 45°, sous pression réduite ; le produit est soumis deux fois encore au même traitement d'éthérification, suivant la méthode de E. FISCHER. La dernière solution dans l'alcool saturé de HCl est alors placée dans le bain-marie à 45°, et on fait agir la trompe jusqu'à ce que le liquide ait perdu environ la moitié de son volume, c'est-à-dire une grande partie de HCl dissous, condition très favorable, comme je l'ai signalé dans le premier chapitre du présent travail, à la cristallisation du chlorhydrate de glycinate d'éthyle. Le liquide refroidi est amorcé avec une trace de ce chlorhydrate, et placé à la glacière dans un mélange de glace et de sel, pendant 4 jours : il s'est alors formé une petite cristallisation de chlorhydrate de glycinate d'éthyle, qu'on enlève par essorage.

Ainsi débarrassé du glycocolle, le mélange des chlorhydrates est évaporé à sec à 45° sous pression réduite, repris par un peu d'eau glacée, et les éthers des aminoacides sont libérés de leurs chlorhydrates par la baryte, recommandée par P. A. LEVENE (4) de préférence à la soude. Les éthers des aminoacides sont extraits par l'éther ordinaire ; la solution éthérée est séchée sur le sulfate de sodium anhydre, puis distillée sous pression réduite au bain-marie à 30°, pour chasser l'éther. Après élimination du véhicule, le résidu est distillé lentement, et l'on recueille tout ce qui passe jusqu'à 60°, sous une pression de 48 mm. de mercure environ. Le liquide huileux recueilli (alaninate d'éthyle) est aussitôt versé dans un grand volume d'eau bouillante, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, où l'on maintient l'ébullition franche pendant deux heures. Finalement la solution est concentrée au bain-marie jusqu'à début de cristallisation, et l'on agite pendant le refroidissement.

La substance essorée, d'un blanc pur, a une saveur sucrée peu intense mais nette ; elle se dissout dans l'eau même à froid, pour donner une

4. P. A. LEVENE. The cleavage products of proteoses (*Journ. biolog. Chem.*, 1, 45, 1905). — P. A. LEVENE et C. A. ALSBERG. The cleavage products of vitellin (*Journ. biolog. Chem.*, 2, 427, 1906). — P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE. Hydrolyse von Wittepepton (*Biochem. Zeitschr.*, 13, 440, 1908). — P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE. The Leucin Fraction of Proteids (*Journ. biolog. Chem.*, 6, 394, 1909).

solution presque neutre qui dissout à chaud l'oxyde cuivrique précipité. Séchée à 110°, elle a été soumise à l'analyse.

Dosage d'azote dans l'alanine purifiée. Méthode Dumas. — Substance : 0 gr. 1392. — Azote dégagé : 19 cc. 8 à 18°5 et 730,6 mm. (21°) = 21 mgr. 7417. — N = 15,62 0/0.

La théorie pour l'alanine pure étant 15,73 0/0, on voit que le contrôle analytique est bon : le dosage de l'azote, joint aux circonstances de la préparation, suffit à caractériser l'échantillon comme de l'*alanine pure*. Il doit être formé de *d alanine*, sauf racémisation partielle qui serait intervenue au cours des manipulations.

Action de la glycérine sur l'alanine à 170°. — Dans un petit vase cylindrique, on place 2 gr. d'alanine pure, on ajoute la petite quantité d'eau bouillante nécessaire pour la dissolution, puis 8 gr. de glycérine à 30° B., et on place sur la tablette de l'étuve, dont la température atteint 170° au bout de 1 heure environ. On n'observe d'abord rien d'autre que le départ de l'eau de dissolution, et le niveau baisse dans le vase cylindrique. Lorsque l'eau cesse de se dégager et le niveau de baisser, on voit le mélange prendre un léger ton jaunâtre, qui au bout de plusieurs heures arrive jusqu'à une teinte madère ; mais la production de matière brune reste toujours insignifiante, et n'a rien de commun avec ce qui a lieu dans le cas du glycocole.

Pendant le séjour du mélange à 170°-175°, on perçoit une *odeur* très nette et assez intense de *noisette grillée* ; j'ai déjà, dans le chapitre consacré à l'*Action de la glycérine sur la leucine*, comparé cette odeur à celle de cacao torréfié que l'on remarque dans le cas de la leucine, et appelé l'attention sur la généralité du phénomène. Ces observations pourraient être utiles pour l'interprétation des réactions qui se passent lors de la torréfaction des graines oléagineuses ; il suffira de se reporter au chapitre concernant la leucine.

Au cours du chauffage à 170°-175°, on prélève de temps en temps, avec une baguette, quelques gouttes du mélange ; on ajoute un peu d'eau, un excès de soude, une trace de sulfate de cuivre : à aucun moment on ne peut observer le moindre indice de la formation d'une substance biurétique.

De temps en temps aussi, on prélève quelques gouttes du mélange, qu'on dissout dans quelques centimètres cubes d'eau, et on ajoute un peu d'une suspension aqueuse d'oxyde cuivrique précipité : au début on obtient une coloration bleue très intense (alaninate de cuivre), mais la réaction diminue peu à peu d'intensité, et finit par disparaître entiè-

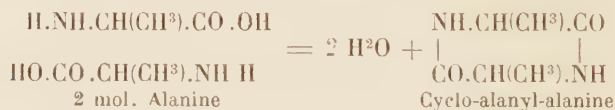
rement au bout de plusieurs heures. L'alanine a totalement disparu : on cesse alors le chauffage.

Le lendemain on trouve la masse glycérinée envahie par un épais feutrage de très fines aiguilles ; on délaye la masse dans l'alcool absolu froid, on essore rapidement, lave encore une fois rapidement par suspension dans l'alcool absolu froid, et cristallise dans le minimum d'alcool absolu bouillant. Les aiguilles blanches obtenues ont été reconnues pour une *cyclo-alanyl-alanine* ; elles fondaient à 279° 280° (corr.), et donnaient à l'analyse, comme on le verra plus loin, 49,31 0/0 d'azote (méthode Dumas). Ce chiffre d'azote est bon, néanmoins il offre un léger écart avec le chiffre théorique (49,72 0/0).

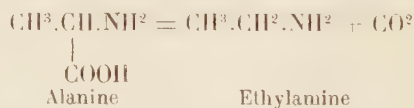
Aussi le corps a-t'il été recristallisé une deuxième fois dans le minimum d'alcool absolu bouillant : le nouveau produit fondait à 282°-282° 5 (corr.), et donnait à l'analyse 49,76 0/0 d'azote (théorie 49,72 0/0).

Dans le cas de l'alanine, le chauffage à 170° au sein de la glycérine n'a pas seulement l'intérêt d'un mode de formation, mais aussi la valeur d'un *procédé de préparation pratique de la cyclo-alanyl-alanine*. En effet, malgré les pertes, on a obtenu 0 gr. 96 de substance pure, à partir de 2 gr. d'alanine, au lieu de 1 gr. 395 que pourrait fournir théoriquement cette alanine. Le rendement pratique est donc ici 60 0/0 ; on pourrait peut-être l'augmenter en diminuant la proportion de glycérine.

Dans le cas de l'alanine, comme dans celui des autres aminoacides déjà étudiés, le produit fondamental de la condensation en présence de la glycérine est donc le cyclodipeptide, et le résultat final de la réaction peut se schématiser par l'équation :



Mais une fraction de l'alanine est consommée en réactions accessoires. Je ne veux pas seulement parler de la décomposition d'un peu d'alanine en éthylamine et CO², suivant l'équation :



bien qu'une telle décomposition soit possible ; mais il se produit certainement autre chose. Au cours du chauffage on perçoit en effet, à côté de l'odeur de noisette grillée, une odeur alcaloïdique spéciale qui

se retrouve nettement dans la masse refroidie. Lorsqu'on a effectué les lavages alcooliques pour éliminer la glycérine, si on chasse l'alcool au bain-marie et qu'on reprenne par l'eau le résidu, la solution aqueuse présente une réaction légèrement alcaline, et montre les réactions des alcaloïdes. Elle donne une précipitation nette avec l'iode en solution dans KI, avec l'iodomercurate de potassium (réactifs de Brücke, Valser, Tanret), avec l'acide picrique ; une précipitation assez abondante avec l'iodobismuthate de potassium (réactif de Dragendorff) ; une précipitation volumineuse avec l'acide phosphotungstique et l'acide silicoduo-décitungstique. En agitant cette solution aqueuse avec de l'éther, puis l'éther avec de l'eau légèrement chlorhydrique, on retrouve sur cette dernière solution aqueuse les réactions des alcaloïdes : tout se passe d'une façon parallèle à ce que l'on a vu à propos de la leucine.

Il est donc probable qu'il se forme, dans le cas de l'alanine comme dans celui de la leucine, un alcaloïde pyrazique ou hydropyrazique dérivé de la cyclo-alanyl-alanine (3.6.diméthyl-2.5.diketopipérazine). La simple perte d'eau permet en effet de passer, du dipeptide cyclique, à la série des bases pyraziques :



Ici encore nous éviterons de nous avancer davantage pour le moment, tout en signalant le très grand intérêt de la formation d'alcaloïdes cycliques par la déshydratation pure et simple des acides α -aminés.

Produit fondamental de condensation de l'alanine. Cyclo-alanyl-alanine — La substance cristallise en fines aiguilles blanches au sein de la glycérine, ou par refroidissement de la solution alcoolique saturée à chaud, ou encore par évaporation rapide de la solution alcoolique moins concentrée. Par évaporation lente de la solution alcoolique, on obtient de petits cristaux prismatiques plus courts, groupés en rosettes.

Le point de fusion a été déterminé en petits tubes scellés, introduits dans un bain d'acide sulfurique et de bisulfate de potassium préalablement porté à une température de plus en plus voisine du point de

fusion (fusion instantanée). On trouve ainsi 282° - $282^{\circ}5$ corr. Chauffée dans un petit tube à essai, la substance se sublime généralement en partie, tandis qu'une autre partie se décompose et charbonne.

La cyclo-alanyl-alanine se dissout facilement dans l'alcool, surtout à chaud. Elle se dissout un peu dans l'eau froide, davantage à chaud ; la solution aqueuse est neutre et ne dissout pas, à l'ébullition, l'oxyde cuivrique précipité.

La cyclo-alanyl-alanine possède une légère saveur amère.

Analyse centésimale. — Le premier dosage d'azote (anal. II) a été fait sur un échantillon recristallisé une seule fois dans l'alcool bouillant, et qui fondait à $279^{\circ}5$ - 280° corr. Les autres dosages ont été faits sur le même échantillon recristallisé à nouveau et fondant alors à 282° - $282^{\circ}5$.

I. — Substance : 0 gr. 2034. — CO^2 : 0 gr. 3787. — H^2O : 0 gr. 1330. — C = 50,78 0/0. — H = 7,28 0/0.

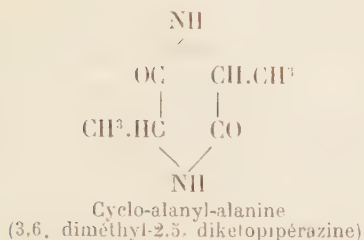
II. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1403. — Azote dégagé : 23 cc. 9 à 18° et 751,5 mm. (18°) = 27 mgr. 0883. — N = 19,31 0/0.

III. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1235. — Azote dégagé : 21 cc. 15 à 18° et 765,2 mm. (20°) = 24 mgr. 4092. — N = 19,76 0/0.

Ces analyses sont résumées dans le tableau suivant :

THÉORIE pour $\text{C}^6\text{H}^{10}\text{N}^2\text{O}^2$		ANALYSE		
		I	II	III
C ⁶ =	72	50,78	—	—
H ¹⁰ =	10	7,28	—	—
N ² =	28	—	19,31	19,76
O ² =	32	—	—	—
	<u>142</u>			
	100,00			

Isomérisie des cyclo-alanyl-alanines. — Le chauffage de l'alanine à 170° au sein de la glycérine fournit donc comme produit fondamental, avec de bons rendements, une *cyclo-alanyl-alanine* (3.6.diméthyl-2.5.dikétopipérazine), fondant à 282° - $282^{\circ}5$ corr. :



Il reste à déterminer de quelle variété stéréoisomérique il s'agit. Afin d'éviter des redites inutiles, je me bornerai, pour faire comprendre le nombre et les relations des diverses variétés stéréoisomériques de cyclo-alanyl-alanines, à renvoyer aux principes que j'ai exposés dans l'*Introduction* de ce volume, et dont j'ai développé un exemple concret, celui des « leucinimides », dans le chapitre consacré à l'*Action de la glycérine sur la leucine*.

Ma nomenclature prévoit la rencontre d'échantillons appartenant à trois variétés individualisées, auxquelles il faut ajouter dans la pratique une variété racémique :

1° *Cyclo-L.alanyl-D.alanine* (identique à la cyclo-D.alanyl-L.alanine), variété trans, où les deux groupements méthyle sont situés de part et d'autre de l'hexagone moléculaire, inactive sur la lumière polarisée, par compensation intrinsèque.

2° *Cyclo-D.alanyl-D.alanine*, variété cis, où les deux groupements méthyle sont situés du même côté de l'hexagone moléculaire, active sur la lumière polarisée.

3° *Cyclo-L.alanyl-L.alanine*, variété cis, antipode de la précédente.

4° *Paire racémique* $\left\{ \begin{array}{l} \text{Cyclo-D.alanyl-D.alanine} \\ \text{Cyclo-L.alanyl-L.alanine} \end{array} \right\}$

optiquement inactive par compensation extrinsèque.

De l'étude historique et critique que l'on va trouver au paragraphe suivant, il ressort que l'on connaît actuellement deux de ces variétés, la *cyclo-D.alanyl-D.alanine* qui fond à 297°, et la *paire racémique* qui fond à 282°-282°. C'est à cette variété racémique qu'appartiennent les échantillons préparés dans mes recherches en traitant l'alanine par la glycérine chaude à 170°.

Historique des cyclo-alanyl-alanines. — La première cyclo-alanyl-alanine décrite l'a été sous le nom de *lactimide*. Dès 1863, à l'ins-tigation de STRECKER, en même temps que A. KOHLER transformait la leucine en leucinimide par chauffage dans un courant de HCl sec,

J. PREU (1) étudiait parallèlement l'alanine. L'alanine est maintenue pendant longtemps au bain d'huile, à 180°-200°, en même temps que passe un lent courant de HCl sec. Quand a cessé le dégagement d'eau, la masse brune refroidie est dissoute dans l'eau, on ajoute à l'ébullition de l'hydrate d'oxyde de plomb, on filtre, élimine le plomb par H²S, filtre, évapore à sec. On reprend le résidu par l'alcool absolu, qui laisse insoluble une certaine quantité d'alanine : l'évaporation de la solution alcoolique abandonne des cristaux incolores.

La *lactimide* de J. PREU constitue des aiguilles et des feuillets incolores et transparents, fondant à 275° sans indication de correction] et qu'on peut sublimer avec quelques précautions. Facilement soluble dans l'eau comme dans l'alcool, de saveur amère, la substance est de caractère indifférent : elle ne dissout pas l'oxyde d'argent à l'ébullition, et ne donne de combinaisons ni avec les acides ni avec les bases. La constitution du corps telle que la conçoit l'auteur, en tant qu'imide de l'acide lactique, n'est évidemment pas exacte ; mais ses analyses concordent avec notre formule actuelle C⁶H¹⁰N²O². La transformation de l'alanine en lactimide par ce procédé donne de mauvais rendements, car une partie notable de l'alanine subit la scission en CO² et éthylamine, que J. PREU a pu caractériser à l'état de chloroplatinate, par le dosage du platine.

Dès ses premières recherches sur les éthers des aminoacides, E. FISCHER (2) a retrouvé la lactimide, produit de décomposition spontanée de l'éther éthylique de l'alanine. Voici ce qu'il dit du phénomène :

« Pour l'odeur et les réactions, le composé [alaninate d'éthyle] ressemble à l'ester glycique, mais s'en distingue par une plus grande stabilité. C'est seulement après des semaines de repos à la température ordinaire, que la préparation laissait reconnaître un changement par la séparation de fines petites aiguilles qui montraient le point de fusion de la *lactimide* connue depuis longtemps.

« Beaucoup plus rapidement se produit la même substance par chauffage en tube scellé à 180°, pendant 24 heures. Le rendement atteignait ici la moitié de l'ester employé, soit 82 0/0 de la théorie, et le produit consistait en longs prismes presque incolores, qui montraient également le point de fusion juste 274° (280° corr.).

« Le procédé est en tous cas à préférer, pour l'obtention du corps, à

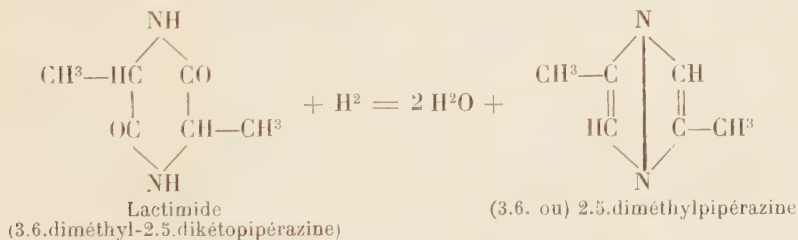
1. J. PREU. Ueber Lactimid (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 134, 372, 1865).

2. E. FISCHER. Ueber die Ester der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 433, 1901).

la vieille méthode, dont PREU lui-même indique qu'elle donne des rendements mauvais. »

Remarquons en passant que E. FISCHER partait ici d'alanine *racémique*, tandis que J. PREU, qui d'ailleurs ne donne aucune indication, utilisait vraisemblablement l'alanine d'hydrolyse protéique, en grande partie formée de d.alanine.

Un peu plus tard, E. HOYER (1), ayant eu besoin de lactimide, l'a préparée d'abord par le procédé de J. PREU, puis par celui de E. FISCHER : il constate que celui-ci donne des rendements très supérieurs. Mais E. HOYER ne donne pas le point de fusion de sa lactimide et ne dit pas de quelle alanine il était parti. Il a réussi la réduction très intéressante de la lactimide, en solution dans l'alcool absolu, par le sodium, et a obtenu ainsi une base fortement alcaline, soluble dans l'eau, très facilement dans l'alcool, entraînable par distillation à la vapeur d'eau, et cristallisant de la ligroïne en feuillets blancs inodores qui fondent entre 103° et 110°. Par le précipité cristallin rouge grenat que donne la solution du chlorhydrate avec l'iodobismuthate de K, par les points de fusion du dérivé benzoylé (F. 227°-228°) et du nitrosé (F. 172°), E. HOYER identifie sa base avec la 2.5.diméthylpipérazine déjà préparée par STÖHR, par BAMBERGER et EINHORN, en réduisant la diméthylpyrazine. Ainsi se trouvent corroborées, par analogie, les vues de R. COHN qui le premier avait rattaché la leucinimide à la série pipérazique et préparé la base de réduction correspondante, sans toutefois parvenir à une purification suffisante et à une caractérisation décisive :



Dans les œuvres postérieures de E. FISCHER, les cyclo-alanyl alanines portent couramment le nom de *alaninanhydrides*. Le premier préparé (2) est comme nous l'avons vu, celui qui dérive de l'alanine racémique, en passant par l'intermédiaire de son éther éthylique. Cet alaninanhy-

1. E. HOYER. Zur Kenntniss der Anhydride der aliphatischen α -Amidocarbonsäuren (*Z. physiol. Chem.*, 34, 347, 1902).

2. E. FISCHER. Ueber die Ester der Aminosäuren (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 433, 1901).

drude subit une hydratation partielle, avec ouverture du cycle pipérazique et transformation en alanyl-alanine, quand on le chauffe avec HCl alcoolique (E. FISCHER et E. FOURNEAU (1), ou mieux encore quand on le laisse pendant plusieurs heures en contact avec la soude étendue (E. FISCHER (2), E. FISCHER et K. KAUTZSCH (3). L'alanyl-alanine ici obtenue est, bien entendu, de l'alanyl-alanine racémique. Inversement, lorsque le dipeptide linéaire est chauffé jusqu'à la fusion, qui a lieu vers 270° (276° corr.), il se transforme (E. FISCHER et K. KAUTZSCH) en alaninanhydride par déshydratation directe :



Enfin, plus récemment, E. FISCHER (4) a réussi à préparer un alaninanhydride optiquement actif, le *d.alanin-anhydride* qui correspond à la *cyclo-d.alanyl-d.alanine* de ma nomenclature. La *d.alanine* est d'abord extraite en abondance des produits d'hydrolyse de la fibroïne de soie. Une partie de cette *d.alanine*, en suspension dans l'alcool absolu, est éthérifiée par le passage de HCl, et transformée en *d.alaninate* d'éthyle; une autre partie, sous l'action du chlorure de thionyle, fournit le chlorhydrate de chlorure de *d.alanyle*. En versant le chlorhydrate de chlorure de *d.alanyle* dans une solution chloroformique de *d.alaninate* d'éthyle, on détermine la copulation des deux molécules et on obtient le chlorhydrate de *d.alanyl-d.alaninate* d'éthyle. Libéré de son chlorhydrate, l'éther du dipeptide est saponifié et fournit alors la *d.alanyl-d.alanine*.

La simple fusion suffirait à transformer la *d.alanyl-d.alanine* en anhydride; mais à haute température il se produit une racémisation, au moins partielle, et l'on n'aurait pas le *d.alanin anhydride* pur. Il faut repasser par le chlorhydrate d'éther du dipeptide, chlorhydrate qui mêlé avec très peu d'alcool est introduit dans environ 10 fois son poids d'alcool absolu saturé à 0° d'ammoniaque, et refroidi à la tempé-

1. E. FISCHER u. E. FOURNEAU. Ueber einige Derivate des Glycokölls (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 34, 2868, 1901).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. IX Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 605, 1905).

3. E. FISCHER u. K. KAUTZSCH. Synthese von Polypeptiden. XII. Alanyl-alanin und Derivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 2375, 1905).

4. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XIV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 453, 1906).

rature 0°. A cette basse température, la rupture de l'éther a lieu sans racémisation : au bout de quelques heures commence la séparation du d.alanin-anhydride en minces et larges feuillets brillants, qu'on recueille après 12 heures. Bien entendu, il est inutile d'isoler au préalable la d.alanyl-d.alanine : lorsqu'on a réalisé la copulation décrite et qu'on a chassé le chloroforme, on dissout le résidu, qui contient le chlorhydrate de l'éther du dipeptide, dans l'alcool absolu, on ajoute une solution étendue d'éthylate de sodium en quantité exactement correspondante au chlore, on sépare NaCl formé, et on sature la solution alcoolique, à 0°, de gaz ammoniac : l'anhydride se dépose au bout de quelques heures.

Il semblerait beaucoup plus simple de ne pas préparer d'abord un dérivé de dipeptide en copulant deux dérivés de la d.alanine, et de partir de celle-ci directement. Le d.alaninate d'éthyle, préparé comme à l'ordinaire, fournit effectivement un anhydride par chauffage prolongé, mais cet anhydride, même formé à 100°, contient une proportion non négligeable de racémique. La décomposition du d.alaninate de méthyle marche encore plus facilement à 100°, mais fournit aussi un anhydride souillé de racémique ; d'autre part la préparation du d.alaninate de méthyle, plus volatil que l'éther éthylique, s'accompagne de pertes sérieuses.

Le *d.alanin-anhydride* pur décrit par E. FISCHER a comme pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -28^{\circ}8 (\pm 0^{\circ}5)$. Chauffé très rapidement dans un tube capillaire, il fond vers 297° (corr.) en un liquide légèrement jaune, après qu'un suintement a eu lieu quelques degrés auparavant.

« Dans les mêmes conditions, dit E. FISCHER, l'alanylanhydride inactif, le seul connu antérieurement, fond 15° plus bas ». Cette remarque place à 282° le point de fusion de l'anhydride inactif, que E. FISCHER avait primitivement (1901) fixé à 280°.

En résumé, le point de fusion des divers échantillons connus de cyclo-alanyl-alanine les classe indiscutablement en deux variétés :

1 ^{re} variété	{	1865. J. PREU, F. 275° non corr. (soit vers 280° corr.).
		1901. E. FISCHER, F. 280° corr.
		1906. E. FISCHER, F. 282° corr.
		1911. L. C. MAILLARD, F. 282°-282°5 corr.
2 ^e variété.		1906. E. FISCHER, F. 297°.

La variété optiquement active, F. 297°, décrite par E. FISCHER en 1906, est la *cyclo-d.alanyl-d.alanine*. La *cyclo-l.alanyl-l.alanine* n'a pas été décrite jusqu'à présent. Rien ne nous autorise à considérer comme *cyclo-l.alanyl-d.alanine* (dérivé trans) le produit optiquement inactif,

F. 282⁰, obtenu, soit à partir de l'alanine racémique (E. FISCHER), soit à partir de la d.alanine mais à haute température dans des conditions racémisantes (J. PREU, L. C. MAILLARD) : par analogie avec le cas de la leucine, je le considère comme le *racémique* formé par la paire d'antipodes [Cyclo-d.alanyl-d.alanine + Cyclo-l.alanyl-l.alanine].

Nous pouvons finalement dresser le tableau suivant des cyclo-alanyl-alanines :

- | | | |
|----------------|--|---|
| 1 ⁰ | <i>Cyclo-l.alanyl-d.alanine</i> | (non décrite). |
| 2 ⁰ | <i>Cyclo-d.alanyl-d.alanine</i> . | 1906. E. FISCHER, F. 297 ⁰ . |
| 3 ⁰ | <i>Cyclo-l.alanyl-l.alanine</i> | (non décrite). |
| | | |
| 4 ⁰ | <i>Racémique</i> { Cyclo-d.alanyl-d.alanine, { | 4865. J. PREU, F. 280 ⁰ |
| | { Cyclo-l.alanyl-l.alanine { | 1901. E. FISCHER, F. 280 ⁰ |
| | | 1906. E. FISCHER, F. 282 ⁰ |
| | | 1911. L. C. MAILLARD, F. 282 ⁰ -282 ⁰ 5 |

Le produit que j'ai obtenu par chauffage de la d.alanine au sein de la glycérine est donc le *racémique*, F. 282⁰-282⁰5.

TROISIÈME PARTIE

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LES HOMOLOGUES DU GLYCOCOLLE EN MÉLANGE

(Synthèse des cyclo-glycyl-glycines mixtes)

CHAPITRE XV

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LE MÉLANGE ALANINE + GLYCINE : SYNTHÈSE DE LA CYCLO-ALANYL-GLYCINE

Action de la glycérine sur le mélange Alanine + Glycine.

— L'échantillon d'alanine employé dans ces recherches est l'alanine purifiée et contrôlée par l'analyse ($N = 15,62$ 0/0) qui avait déjà servi à étudier l'*Action de la glycérine sur l'alanine* isolée. Le glycocolle était l'échantillon pur et contrôlé qui a servi à toutes les recherches décrites dans la Première Partie du travail.

Des quantités équimoléculaires des deux aminoacides, soit 2 gr. 67 d'alanine et 2 gr. 25 de glycocolle, sont placées dans un petit vase cylindrique, et dissoutes dans le minimum d'eau bouillante. On ajoute 20 gr. de glycérine à 30° B., et on porte à l'étuve dont on élève progressivement la température jusqu'à 170°. Après départ de l'eau de dissolution, on voit la masse prendre une légère coloration brun clair, qui ne répond d'ailleurs qu'à une quantité de matière colorante insignifiante, et n'a rien de commun avec la forte coloration brun-noir qui se développe dans le cas du glycocolle isolé. Pendant le chauffage on perçoit nettement l'odeur de noisette grillée que j'ai signalée dans le chapitre consacré au traitement de l'alanine isolée, et sur laquelle je n'insiste pas, pas plus que sur une petite quantité d'alcaloïde (probablement pyrazique ou hydropyrazique) qui prend naissance comme à l'ordinaire. La réaction du biuret, essayée à diverses reprises au cours du chauffage, n'a jamais donné de résultat.

Lorsque la masse a perdu la faculté de dissoudre l'oxyde cuivrique précipité, c'est-à-dire quand l'anhydrisation est complète, on laisse refroidir : aucun cristal n'apparaît dans la masse. Délayée dans l'alcool absolu, la masse se dissout entièrement, sans qu'aucun cristal appa-

raisse, même après plusieurs semaines de repos, que l'alcool soit ajouté en proportion faible ou forte.

J'ai pu heureusement résoudre la difficulté par l'artifice suivant, que j'ai appliqué ensuite d'une façon générale à l'isolement des cyclo-glycyl-glycines incluses dans la glycérine, et que je décris une fois pour toutes. La masse glycinée, refroidie, est délayée dans un volume d'alcool absolu juste suffisant pour donner à la solution assez de fluidité pour lui permettre de traverser facilement la rondelle de papier d'un entonnoir à essorage (2 volumes d'alcool environ). Le liquide alcoolique est introduit dans un flacon, et, qu'il s'y soit ou non produit une cristallisation, additionné de 3 fois son volume d'éther ordinaire. On agite énergiquement, il se produit aussitôt un abondant trouble laiteux dû à la précipitation de la glycérine en gouttelettes qui se rassemblent rapidement en une couche au fond du flacon. Puis les cyclo-glycyl-glycines se séparent à leur tour, et il suffit d'abandonner le flacon pendant quelque temps pour voir les cristaux se former sur les parois du flacon et au sein de la couche de glycérine ; le lendemain la cristallisation est terminée. Si même l'alcool seul avait déjà produit un début de cristallisation, ou si l'on possède quelques parcelles, provenant d'une préparation antérieure, qui puissent servir à l'ensemencement, le dépôt est complet en une heure ou deux.

On introduit alors dans le goulot du flacon un tube en verre dont l'extrémité descend presque jusqu'au niveau du liquide, et qui est relié d'autre part à une trompe. L'aspiration d'air entraîne en abondance les vapeurs d'éther, qui disparaît assez rapidement du flacon, en même temps que la réfrigération produite par son évaporation protège les cristaux contre une redissolution possible. La glycérine, au contraire, se redissout par agitation dès que le titre en éther de la solution éthéro-alcoolique a suffisamment baissé ; on filtre alors à la trompe, on fait un rapide lavage avec un peu d'alcool, et on recueille ainsi la masse cristalline, débarrassée de la glycérine.

Dans le cas particulier (Alanine + Glycine) qui nous occupe, les cristaux recueillis et ceux qui sont restés adhérents aux parois du flacon sont très aisément dissous par un peu d'eau chaude ; on évapore à sec, on redissout le résidu dans l'alcool bouillant, et on obtient par refroidissement une masse cristalline incolore, qui est essorée et séchée dans le vide sur H^2SO^4 .

Le point de fusion de ces cristaux a été recherché, comme d'ordinaire, en tube capillaire scellé, au bain sulfurique, et en cherchant à obtenir une fusion rapide. Mais l'échantillon n'a pas fourni un point de fusion net : on voit d'abord, en examinant à la loupe, apparaître des

petits points brunâtres vers 230° ; vers 250° la totalité est fortement brune, sans être fondue ; vers 260° la masse noirâtre est fluidifiée. Cette allure à la fusion me donnait des soupçons sur la pureté du corps. La présence d'une substance étrangère à côté de la substance principale a été confirmée par le dosage de l'azote.

Dosage d'azote. — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1166. — Azote recueilli : 23 cc. 1 à $15^{\circ}5$ et 765,3 mm. = 26 mgr. 995. — N = 23,15 0/0.

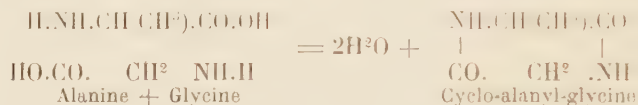
La teneur théorique pour la cyclo-alanyl-glycine attendue étant N = 21,875 0/0, le chiffre trouvé N = 23,15 0/0 montre que l'échantillon doit être souillé d'un autre corps plus riche en azote, qui ne peut être que la cyclo-glycyl-glycine (N = 24,56 0/0). S'il s'est formé au cours de la réaction une quantité, même très minime, de cette substance difficilement soluble dans l'alcool, elle doit être accumulée presque totalement dans les premiers cristaux recueillis : une teneur moyenne même très faible de la masse en cyclo-glycyl-glycine peut donner une teneur notable dans cette première fraction, la moins soluble dans l'alcool. Pour contrôle, j'ai constaté *de visu* la présence de la cyclo-glycyl-glycine dans cette fraction ; une parcelle est mise en solution aqueuse, dont des gouttelettes sont évaporées sur lames : au microscope on observe, à côté d'aiguilles qui sont évidemment le cyclo-dipeptide mixte, les lamelles larges et très minces de la cyclo-glycyl-glycine, souvent groupées en dendrites d'aspect *foliacé* caractéristique.

Pour obtenir un échantillon de cyclodipeptide mixte, bien exempt de cyclo-glycyl-glycine, tout ce qui reste des produits de la première préparation est ajouté au produit d'une deuxième préparation, conduite exactement de la même façon. On verse sur la masse cristalline de l'alcool absolu bouillant, qu'on ne laisse séjourner que quelques instants, de façon à n'enlever que la partie la plus soluble et à laisser dans le cristalliseur une fraction assez notable, de solubilisation moins facile. La solution alcoolique est évaporée à sec, et son résidu est repris de nouveau par l'alcool bouillant, en ayant soin d'écarter encore un résidu moins facilement soluble. On recommence une troisième fois : il est certain que la presque totalité de la cyclo-glycyl-glycine a été éliminée dans les trois résidus successifs. La dernière solution alcoolique est concentrée jusqu'à cristallisation commençante et abandonnée au refroidissement ; les cristaux essorés, séchés dans le vide sur H^2SO_4 , sont d'un blanc pur, et ont été reconnus comme de la cyclo-alanyl-glycine pure.

Les expériences précédentes mettent en lumière la remarquable teneur que possèdent l'alanine et la glycine, lorsqu'elles sont en

mélange, à s'enchaîner en anhydride mixte, au lieu de s'anhydriser chacune pour son compte, côte à côte et d'une manière indépendante. La prépondérance de l'enchaînement *mixte* est un phénomène général, dont nous retrouverons plus loin des exemples, et qui n'est sans doute pas sans importance pour la construction des enchaînements variés que possèdent les protéiques naturels.

Produit fondamental de la condensation. Cyclo-alanyl-glycine. — Les analyses du produit fondamental concordent, comme on le verra, avec la formule $C^5H^8N^2O^2$ qui est celle de la *cyclo-alanyl-glycine* :



La substance constitue de fines aiguilles blanches qui présentent un point de fusion net à 229^0 corr., et se dissolvent assez facilement dans l'eau, très facilement dans l'alcool chaud d'où la substance cristallise par refroidissement. La solution aqueuse est neutre et ne dissout pas l'oxyde cuivrique précipité.

Analyse centésimale. — Les analyses ont été faites sur le produit séché à froid dans le vide sur H^2SO^4 .

I. — Substance : 0 gr. 2011. — CO^2 : 0 gr. 3396. — H^2O : 0 gr. 1141. — C = 46,05 0/0. — H = 6,32 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 1085. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 20 cc. 05 à 16^0 et 766,1 mm. (16^0) = 23 mgr. 399. — N = 21,57 0 0.

III. — Substance : 0 gr. 1114. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 20 cc. 7 à 14^0 5 et 765,9 mm. (15^0) = 24 mgr. 320. — N = 21,83 0 0.

Les analyses sont réunies dans le tableau suivant :

THÉORIE pour $C^5H^8N^2O^2$		ANALYSE		
		I	II	III
C =	60	46,05	—	—
H =	8	6,32	—	—
N =	28	—	21,57	21,83
O =	32	—	—	—
	128			
	428			

Point de fusion. — Le point de fusion a été pris en petits tubes scellés, au bain sulfurique, en relevant progressivement la température d'immersion du tube jusqu'à fusion rapide. Quatre déterminations faites dans de bonnes conditions (immersion entre 200° et 205°) ont donné respectivement, après calcul des corrections, les points de 229°0, 228°8, 229°5, 228°8. Je crois donc pouvoir assigner au corps un *point de fusion bien déterminé à 229° corr.* : la fusion est nette, le corps passe de l'état pâteux à l'état fluide en moins de 1/2 degré, en même temps qu'il brunît et se décompose.

Si je donne ces détails, c'est que le même cyclodipeptide racémique a déjà été préparé par E. FISCHER et E. OTTO (1) sous le nom de Glycyl-alanin-anhydride (Méthyldiacipipérazine) : d'après leur description « il se colore en brun par chauffage à 236°, et fond par chauffage rapide, avec décomposition, à 238°-239° (244°-245° corr.) ». D'autre part, E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (2) ont isolé, dans l'hydrolyse de la fibroïne de soie, un dipeptide cyclique qui, « non seulement a la même composition, mais offre aussi mainte ressemblance extérieure avec le glycyl-alanin-anhydride inactif précédemment décrit. Ainsi, chauffé dans un tube capillaire, il commence vers 235° à devenir brun, et fond entre 240° et 242° (corr.) avec faible décomposition et sublimation partielle ». Il s'agit ici d'un cyclo-dipeptide optiquement actif, dérivé de la d.alanine, et qui est dans ma nomenclature la cyclo-d alanyl-glycine. Enfin E. FISCHER et A. SCHULZE (3), abandonnant en solution alcoolique froide (0°) saturée de gaz ammoniac le chlorhydrate de glycyl-d.-alaninate d'éthyle préparé synthétiquement, ont obtenu le même glycyl-d.alanin-anhydride, qui « prend une coloration foncée vers 240° (corr.) par chauffage rapide en tube capillaire, et fond d'une façon pas tout à fait constante jusqu'aux environs de 247°, en une masse foncée, en même temps qu'une petite partie se sublime ».

Toutes ces observations de E. FISCHER et de ses collaborateurs ont ceci de commun que leurs échantillons se décomposent et brunissent *avant de fondre*. Or j'ai observé la même allure sur le premier échantillon préparé par moi, mais il a été reconnu que cet échantillon n'était pas pur et contenait un peu de 2.5.diacipipérazine ; débarrassé de cette substance, il ne se décomposait plus qu'au moment même de la fusion,

1. E. FISCHER u. E. OTTO. Synthese von Derivaten einiger Dipeptide (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 36, 2106, 1903).

2. E. FISCHER u. E. ABDERHALDEN. Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroïns (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 752, 1906).

3. E. FISCHER u. A. SCHULZE. Synthese von Polypeptiden. XVI. Derivate des d. Alanins (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 40, 943, 1907).

très nettement placée à 229° corr. Je serais donc porté à croire que c'est cette dernière détermination qui correspond le mieux à la réalité.

Isomérisie des cyclo-alanyl-glycines. — L'un des deux construits de l'anneau des cyclo-alanyl-glycines, le glycolle, ne présentant pas d'isomérisie stériques, les variétés de cyclo-alanyl-glycines sont moins nombreuses que celles de cyclo-alanyl-alanines ou de cyclo-leucyl-leucines par exemple. Ma nomenclature prévoit deux antipodes :

1° *Cyclo-d.alanyl-glycine* ;

2° *Cyclo-l.alanyl-glycine* ;

auxquels il faut ajouter en pratique le racémique formé par leur ensemble :

3° *Paire racémique* $\left\{ \begin{array}{l} \text{Cyclo-d.alanyl-glycine} \\ \text{Cyclo-l.alanyl-glycine} \end{array} \right.$

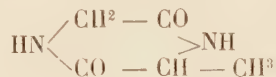
La synthèse du *racémique* a été réalisée en 1903 par E. FISCHER et E. ORRO (*loc. cit.*). On prend de l'alaninate d'éthyle (racémique) en solution étherée, et on ajoute une solution étherée de chlorure de chloracétyle : on obtient le chloracétyl-alaninate d'éthyle



Chauffé pendant 4 heures à 100° avec de l'ammoniaque alcoolique saturée à 0°, ce corps se transforme passagèrement en glycyl-alaninate d'éthyle



qui, vu les conditions du milieu, perd de l'alcool et se cyclise en glycyl-alanin-anhydride (méthylidiacipipérazine)



Le corps est facilement soluble dans l'eau et dans l'alcool chaud, difficilement dans l'acétone ; il a une réaction neutre et est dépourvu de saveur.

La *cyclo-d.alanyl-glycine* obtenue par E. FISCHER et E. ABDERHALDEN en 1906 à partir de la soie, ne préexiste pas sous forme d'anhydride dans les produits d'hydrolyse de cette matière, mais bien sous celle d'un dipeptide linéaire (glycyl-d.alanine plutôt que d.alanyl-glycine) que l'on s'arrange pour étherifier à basse température (pour éviter la racémisation) et qu'on abandonne ensuite en solution alcoolique saturée d'am-

moniaque, où se produit la cyclisation. L'anhydride se dissout facilement dans l'eau, assez facilement dans l'alcool chaud, et possède une saveur faiblement amère. Contrairement à l'anhydride synthétique précédemment décrit, qui est inactif, il est lévogyre : $[\alpha]_D^{20} = -3^{\circ}9$, ce pouvoir étant d'ailleurs sans doute abaissé par une certaine proportion de racémique.

La même *cyclo-d.alanyl-glycine* a été préparée synthétiquement par E. FISCHER et A. SCHULZE (*loc. cit.*) en 1906. Le d.alaninate d'éthyle est copulé avec le chlorure de chloracétyle, ce qui donne le chloracétyl-d.alaninate d'éthyle : celui-ci, après traitement par l'ammoniaque aqueuse et saponification, donne la glycyl d.alanine. Ce dipeptide linéaire est à nouveau éthérifié par HCl dans l'alcool absolu, puis le chlorhydrate de glycyl-d.alaninate d'éthyle est abandonné en solution alcoolique saturée d'ammoniaque à 0° : la cyclisation a lieu et l'anhydride se dépose. Il se dissout facilement dans moins de 4 fois son poids d'eau chaude, d'où il cristallise par refroidissement ; il est assez facilement soluble dans l'alcool chaud, très difficilement dans l'éther et l'éther de pétrole. Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{20} = -5^{\circ}0$. Il paraît évidemment plus simple, pour obtenir l'anhydride, d'abandonner directement le chloracétyl-d.alaninate d'éthyle en solution alcoolique saturée d'ammoniaque ; mais à la température ordinaire la formation de l'anhydride est très lente, et si l'on chauffe à 100° pour la réaliser en quelques heures, une partie non négligeable de la substance est racémisée.

Je n'ai jusqu'à présent rencontré dans la littérature aucun document relatif à la *cyclo-l.alanyl-glycine*.

Le caractère vague des données fournies par E. FISCHER et ses collaborateurs en ce qui concerne le point de fusion des variétés étudiées par eux, ne me permet pas de recourir à cette constante pour identifier la variété que j'ai eu moi-même entre les mains. Toutefois, par analogie avec ce qui a lieu dans le cas de la cyclo-alanyl-alanine, je crois pouvoir admettre que le chauffage prolongé à 170° au sein de la glycérine s'est accompagné de racémisation : la substance que j'ai obtenue serait ainsi la *cyclo-alanyl-glycine racémique*.

CHAPITRE XVI

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LE MÉLANGE LEUCINE + GLYCINE : SYNTHÈSE DE LA CYCLO-LEUCYL-GLYCINE

Action de la glycérine sur le mélange Leucine - Glycine.

— La leucine employée dans ces recherches était l'échantillon racémique de d.l.leucine pure, qui avait servi pour la synthèse de la cyclo-leucyl-leucine par *Action de la glycérine sur la leucine* (p. 253). Le glyco-colle était le produit pur déjà employé dans tout le cours du présent travail.

L'étude de la condensation d'un mélange de leucine et de glycine, au sein de la glycérine chaude, présente une certaine difficulté matérielle, à cause de l'insuffisante solubilité de la leucine. Les acides aminés, finement pulvérisés, étaient placés, avec 4 fois leur poids de glycérine pure à 30° B., au fond d'un large tube ayant 25 millimètres de diamètre intérieur, et long d'environ 45 centimètres, de telle façon qu'en le disposant presque verticalement dans l'étuve à 175°, l'extrémité libre du tube émergeât à la partie supérieure de l'étuve. La leucine vient constamment cristalliser en paillettes qui forment chapeau au-dessus de la glycérine, ainsi qu'il a été dit au Chapitre XIII (p. 254). Pour remédier à cet inconvénient, j'introduisais dans le tube à réaction un long tube dont l'extrémité inférieure était soufflée en une boule de diamètre presque égal au calibre du tube à réaction, réalisant ainsi une sorte de piston dont quelques mouvements verticaux de va-et-vient suffisaient à brasser de temps en temps le mélange d'une manière efficace, et à replonger au sein de la glycérine la leucine qui s'en échappait constamment par cristallisation à la surface.

Mes premiers essais ont porté sur un mélange *équimoléculaire* des deux acides aminés, en présence de 4 fois leur poids de glycérine à 30° B. Mais le mélange équimoléculaire présente un grave inconvénient : malgré la

tendance à l'enchaînement mixte, la leucine n'est présente à l'état dissous au sein de la glycérine qu'en si faible proportion, qu'elle ne peut donner naissance qu'à une petite quantité de cyclo-leucyl-glycine. Pendant ce temps le glyocolle se dissout intégralement dans la glycérine, où il est donc en réalité en fort excès par rapport à la leucine, et cet excès de glyocolle, ne trouvant en face de lui aucun acide aminé d'espèce différente, s'anhydrise pour son propre compte en cyclo-glycyl-glycine. Lorsque les dernières portions de la leucine finissent par entrer à leur tour en solution dans la glycérine chaude, elles ne trouvent plus en face d'elles de glyocolle libre et s'anhydrisent pour leur compte en cyclo-leucyl-leucine. On doit donc trouver finalement dans le produit un mélange des trois anhydrides, le mixte et les deux homogènes, ce qui rend très difficile le fractionnement. Si on arrête le chauffage à un stade moins avancé de la réaction, on trouve de la leucine inaltérée qui, elle aussi, gêne les fractionnements. De fait, je n'ai obtenu, avec les mélanges équimoléculaires, que de mauvais rendements.

Mais comme on ne peut, pour la raison qui vient d'être dite, éviter la formation simultanée de cyclo-glycyl-glycine, il importe peu d'en trouver une proportion plus ou moins forte dans le produit. Au contraire, il y a tout intérêt à disposer d'un excès de glyocolle, pour subvenir à la formation de l'anhydride mixte, et empêcher la leucine de se transformer partiellement en leucinimide. Aussi ai-je employé le glyocolle en quantité plusieurs fois supérieure à ce que comporterait un mélange équimoléculaire ; il m'a paru d'ailleurs que cette manière de faire favorisait la solubilisation de la leucine.

Pour 2 gr. de d.l.leucine, on prend 4 gr. de glyocolle, soit environ 3,5 fois la quantité équimoléculaire, et 30 gr. de glycérine à 30° B. ; le tout est placé dans le tube vertical, et l'étuve est portée rapidement à 175°. On brasse de temps en temps avec l'agitateur ci-dessus décrit. La masse prend une coloration brune assez accentuée ; on perçoit l'odeur de cacao comme dans le traitement de la leucine isolée, et aussi l'odeur vireuse que nous avons attribuée vraisemblablement (Chapitre XIII, p. 256) à un alcaloïde pyrazique ou hydropyrazique. Des prises d'essai du mélange, prélevées à divers moments, ne m'ont fourni que d'une manière insignifiante la réaction du biuret.

Les paillettes de leucine disparaissent assez vite. On prélève alors de temps en temps quelques gouttes du mélange, on fait bouillir avec un peu d'eau et de noir animal, on filtre et on cherche si le filtrat possède encore la capacité de dissoudre l'oxyde cuivrique précipité. Lorsque le mélange a perdu cette propriété, on arrête le chauffage.

La masse refroidie est délayée dans 2 fois son volume d'alcool absolu, le tout est additionné de 3 volumes d'éther, et abandonné jusqu'au lendemain, ce qui détermine une abondante cristallisation. Puis l'éther est chassé à la trompe, ainsi qu'il a été expliqué au Chapitre XV, et les cristaux, qui ne se redissolvent pas, sont séparés par essorage du mélange d'alcool et de glycérine qui les baigne.

La masse cristalline contient une grande quantité de cyclo-glycyl-glycine (2.5. diacipipérazine), à laquelle se trouve mêlé, si la préparation a réussi, le dérivé mixte que nous cherchons. Examinée au microscope, la masse m'a montré, outre les feuillets bien connus de la cyclo-glycyl-glycine, de fines aiguilles semblant appartenir à une autre substance et qui se dissolvaient aisément dans l'alcool chaud. J'ai donc employé l'alcool pour le fractionnement

Sur la masse cristalline on verse de l'alcool bouillant, et on maintient quelques minutes sur le bain-marie en agitant, mais en ayant soin de laisser indissoute une fraction importante de la masse. Cette partie, celle qui résiste le plus à la dissolution alcoolique, doit être constituée surtout par de la cyclo-glycyl-glycine : je m'en suis assuré au microscope. La solution alcoolique doit contenir le dérivé mixte cherché, mais souillé encore d'une notable quantité de cyclo-glycyl-glycine ; elle est donc évaporée à sec, et le résidu est repris rapidement par l'alcool bouillant, de façon à laisser encore de côté la fraction la moins soluble (1). On évapore de nouveau à sec la solution alcoolique, et on fait un troisième épuisement alcoolique rapide en laissant toujours de côté la partie la moins soluble. Enfin on exécute un quatrième épuisement du même genre.

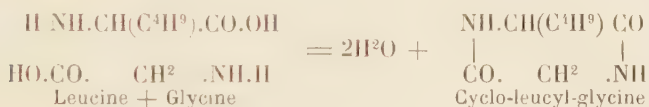
La quatrième solution alcoolique est alors concentrée fortement, de façon à fournir par refroidissement une abondante cristallisation, en ne laissant que quelques gouttes d'eau-mère destinée à retenir les traces de glycérine entraînée. Bien débarrassés de l'eau-mère, les cristaux sont encore redissous dans l'alcool, la solution alcoolique est concentrée fortement de façon à ne laisser lors de la cristallisation que quelques gouttes d'eau-mère, qui éliminent les dernières traces de glycérine.

Les derniers cristaux, formés de fines aiguilles blanches, sont alors soumis à l'analyse. Ils ont donné pour l'azote $N = 16,70$ 0/0, alors que la théorie pour la *cyclo-leucyl-glycine* est 16,47. Pour s'assurer que le fractionnement avait néanmoins fourni une substance presque pure,

1 Ce deuxième résidu a donné à l'analyse (méthode Dumas) $N = 21,66$ 0/0, preuve qu'il est encore riche en cyclo-glycyl-glycine, dont la teneur est $N = 24,56$ 0/0.

l'échantillon restant a été redissous dans l'alcool, et concentré avec ménagement de façon à recueillir, à la cristallisation, environ la moitié du poids de cet échantillon. L'analyse de cette nouvelle fraction a donné $N = 16,47$ 0/0, chiffre qui ne s'écarte pas beaucoup de celui que fournissait l'échantillon total, et qui coïncide précisément avec la teneur théorique de la cyclo-leucyl-glycine. Aucun doute ne peut donc subsister sur l'obtention d'un produit presque pur et suffisant pour l'identification.

Produit fondamental de la condensation. Cyclo-leucyl-glycine. — La masse cristalline résultant de la condensation au sein de la glycérine se compose donc de deux substances : l'une est la cyclo-glycyl-glycine (2,5-diacipipérazine) qui dérive de l'excès de glycocolle, et qui n'offre ici aucun intérêt particulier ; l'autre fournit des chiffres d'analyse concordant avec la formule $C^8H^{14}N^2O^2$, qui est celle de la *cyclo-leucyl-glycine* :



La substance, facilement soluble dans l'alcool chaud, cristallise par refroidissement en très fines aiguilles blanches enchevêtrées. Elle se dissout dans une assez grande quantité d'eau chaude, et par concentration puis évaporation lente, on l'obtient à l'état de cristaux radiés groupés en druses qui flottent à la surface du liquide, à la façon d'une substance qui se mouillerait difficilement. La solution aqueuse est neutre et ne dissout pas l'oxyde cuivrique précipité. Elle possède une saveur amère.

Analyse centésimale. — Les analyses ont été faites sur le produit séché à froid dans le vide sur H^2SO^4 .

I. — Substance : 0 gr. 1218. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 17 cc. 6 à $18^{\circ}5$ et 767,1 mm. (13°) = 20 mgr. 3403. — $N = 16,70$ 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 1338. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 19 cc. 3 à 19° et 760,0 mm. (14°) = 22 mgr. 0367. — $N = 16,47$ 0/0.

Les analyses sont réunies dans le tableau suivant :

THÉORIE		ANALYSE	
pour $C^8H^{15}N^2O^2$		I	II
$C^8 =$	96	—	—
$H^{15} =$	14	—	—
$N^2 =$	28	16,70	16,47
$O^2 =$	32	—	—
	170		
	100,00		

Point de fusion. — Le point de fusion a été pris par la méthode des petits tubes scellés plongés dans le bain sulfurique déjà chauffé à température voisine de ce point, de manière à se rapprocher autant que possible de la fusion instantanée.

La détermination du point de fusion n'est pas aisée. Si l'élévation de la température du bain n'est pas très rapide, on voit la substance devenir d'abord pâteuse et brunir avant de fondre ; il n'est pas possible de fixer une limite déterminée. Toutefois, en opérant rapidement, j'ai pu obtenir plusieurs déterminations concordantes, où la substance fondait nettement en un liquide presque incolore, avant de se colorer en brun. Ce point de fusion se place vers 227° corr. ; je ne pense pas qu'il puisse être notablement supérieur.

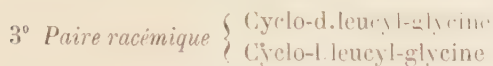
On verra tout à l'heure que des échantillons de cyclo-leucyl-glycine ont été préparés déjà (sous le nom de leucyl-glycin-anhydride) par E. FISCHER et ses collaborateurs, qui ont trouvé un point de fusion plus élevé 244° - 245° : nous avons ici un écart de 17° - 18° qui est déjà notable. Mais il est certain que mes propres échantillons, malgré les précautions prises pour éliminer la cyclo-glycyl-glycine, devaient renfermer encore des traces de ce corps, traces insuffisantes pour affecter sensiblement les chiffres d'analyse, mais qui peut-être influençaient encore le point de fusion. Je n'entends donc nullement garantir le point 227° corr. que je donne ici, et j'admets qu'il est peut-être un peu faible.

Isomérisie des cyclo-leucyl-glycines. — L'un des deux constituants de l'anneau des cyclo-leucyl-glycines, le glycocole, ne présentant pas d'isomérisie stériques, les variétés prévues par ma nomenclature se réduisent à deux antipodes :

1^o *Cyclo-d.leucyl-glycine.*

2^o *Cyclo-l.leucyl-glycine.*

auxquels il faut ajouter en pratique le racémique formé par leur ensemble :



Le *racémique* a été obtenu déjà par E. FISCHER (1). Lorsqu'on introduit du chlorhydrate de chlorure de leucyle dans une solution étherée de glycinate d'éthyle, on obtient l'union des deux molécules en un chlorhydrate de leucyl-glycinate d'éthyle, que E. FISCHER n'a d'ailleurs pas isolé. Mais en dissolvant dans l'eau ou dans l'alcool ce chlorhydrate d'éther de dipeptide, ajoutant de l'ammoniaque et concentrant au bain-marie, l'éther de dipeptide perd une molécule d'alcool, et l'on voit cristalliser le leucylglycinanhydride (cyclo-leucyl-glycine racémique), en fines aiguilles incolores fondant à 244° corr. En préparant le chlorhydrate de leucyl-glycinate d'éthyle par éthérification de la leucyl-glycine elle-même, puis soumettant le chlorhydrate au traitement ammoniacal, E. FISCHER (1) a retrouvé naturellement le même anhydride.

En même temps A. BRUNNER (2), au laboratoire de E. FISCHER, préparait le leucyl-glycinanhydride par simple fusion de la leucyl-glycine à 235°-240° ; après 15 minutes on laisse refroidir la masse qui se prend en bloc, on dissout dans l'alcool chaud ; et par refroidissement on obtient une masse filamenteuse d'aiguilles incolores. La substance se dissout dans 40 fois environ son poids d'eau chaude, et par refroidissement cristallise lentement en gros prismes durs souvent maclés. F. 245°. La substance sèche paraît d'abord dénuée de saveur, par suite de la lenteur avec laquelle elle est mouillée par l'eau ; ensuite on perçoit un intense arrière-goût amer.

Le même anhydride racémique a été reproduit par O. WARBURG (3) au laboratoire de E. FISCHER, en fondant non plus la leucyl-glycine, mais la glycyl-leucine : ce nouvel échantillon présentait toutes les propriétés de celui de A. BRUNNER, et fondait également à 245° corr.

Le leucyl-glycinanhydride, à l'exemple de la 2.5.dikétopipérazine, ouvre son anneau moléculaire par contact à froid avec la soude ; mais cette ouverture peut se faire en deux points différents, et suivant le cas,

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 38, 605, 1905).

2. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XI (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 340, 123, 1905). [2-Leucyl-glycin und Alanyl-leucyl-glycin, von A. BRUNNER].

3. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XI (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 340, 123, 1905). [3-Glycyl-leucin, Alanyl-leucin, Leucyl-alanin, Glycyl-alanyl-leucin und aktives Alanyl-glycin, von O. WARBURG].

l'anhydride donnera naissance soit à la leucyl-glycine soit à la glycyl-leucine. E. FISCHER et W. SCHRAUTH (1) ont constaté la formation simultanée des deux dipeptides, mais en proportions inégales : environ 2 tiers de leucyl-glycine pour 1 tiers de glycyl-leucine.

D'autre part, la *cyclo-l.leucyl-glycine*, optiquement active, est connue également : E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (2) l'ont rencontrée dans leurs recherches sur l'hydrolyse ménagée de l'élastine par simple séjour prolongé à froid dans H^2SO_4 à 70 0/0. Après l'éthérification des produits d'hydrolyse par l'alcool absolu et HCl, libération des éthers de leurs chlorhydrates par l'éthylate de sodium, épuisement par l'éther ordinaire qui dissout les éthers éthyliques des aminoacides eux-mêmes, il reste une fraction insoluble dans l'éther ordinaire, où les auteurs recherchent les éthers éthyliques de dipeptides. Ce résidu est dissous dans l'alcool chaud ; après refroidissement on sature de gaz ammoniac, et on abandonne : au bout de 2 jours commence la séparation d'une masse en grande partie amorphe parsemée de fines aiguilles, qu'on purifie par redissolution à chaud dans l'acétone ou dans l'alcool. La substance a la composition d'un anhydride double de leucine et de glycine, fond vers 253° corr., et possède un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = + 29^{\circ}2$.

La même cyclo-l.leucyl-glycine (l.leucyl-glycinanhydride) a été reproduite par E. FISCHER (3) à partir de la l.leucyl-glycine synthétique. Ce dipeptide, suspendu dans l'alcool méthylique sec, est éthérifié par un courant de HCl ; le chlorhydrate de l.leucyl-glycinate de méthyle isolé est dissous dans un peu d'alcool méthylique et versé dans de l'alcool méthylique saturé de gaz ammoniac. Au bout de 1-2 heures commence la séparation d'une masse gélatineuse qui après 24 heures remplit tout le liquide. C'est l'anhydride, assez difficile à purifier, qui, chauffé au tube capillaire, commence vers 249° à suinter et à se colorer, et fond complètement vers 254° - 255° . Le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{20} = + 31^{\circ}7$. (La substance obtenue à partir de l'élastine avait donné $[\alpha]_D^{20} = + 29^{\circ}2$, mais elle renfermait sans doute un peu de racémique). La solution aqueuse a une saveur fortement amère. L'anhydride actif se distingue du racémique par son point de fusion plus

1. E. FISCHER u. W. SCHRAUTH. Aufspaltung von Diketopiperazinen und Dipeptide des Tyrosins (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 354, 21, 1907)

2. E. FISCHER u. E. ABDERHALDEN. Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 2315, 1906).

3. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. XV (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 39, 2893, 1906).

élevé, sa solubilité beaucoup plus grande dans l'eau, et par sa tendance beaucoup plus faible à la cristallisation.

Quant à l'autre antipode optique, la *cyclo-d.leucyl-glycine*, il n'a pas encore été observé, à ma connaissance du moins.

La *cyclo-leucyl-glycine* obtenue dans mes recherches est évidemment le *racémique*. Elle a été préparée au moyen de la leucine racémique ; et d'ailleurs, eût-elle été préparée à partir d'un aminoacide actif, nous avons vu qu'en général la synthèse des cyclo-glycyl-glycines par ma méthode s'accompagne d'une racémisation.

CHAPITRE XVII

ACTION DE LA GLYCÉRINE SUR LE MÉLANGE LEUCINE + VALINE : SYNTHÈSE DE LA CYCLO-LEUCYL-VALINE.

Une *cyclo-leucyl-valine* a été rencontrée parmi les produits d'action de la glycérine à 170° sur des échantillons de valine contenant, à côté de cette substance, une petite quantité de leucine. Trois échantillons de ce genre ont tous trois fourni de la cyclo-leucyl-valine.

Première préparation de cyclo-leucyl-valine. — La *valine*, acide α -aminoisovalérique $\begin{matrix} \text{CH}^3 \\ \text{CH}^3 \end{matrix} \text{ > CH. CH(NH}^2\text{).COOH}$, mise en œuvre dans cette préparation, avait été retirée des produits d'hydrolyse chlorhydrique de la corne de bœuf, en fractionnant ces produits suivant la technique de E. FISCHER puis de P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE. Le mélange des chlorhydrates d'aminoacides provenant de l'hydrolyse est éthérifié, en suspension dans l'alcool absolu, par un courant de HCl sec introduit jusqu'à saturation : l'éthérification est renouvelée à trois reprises, séparées par des évaporations à sec à 40° sous pression réduite. Les chlorhydrates d'éthers sont redissous dans un peu d'eau glacée, et les éthers des aminoacides sont libérés de leurs chlorhydrates, non pas par le carbonate de potassium et la soude comme dans la technique de E. FISCHER, mais par la baryte en poudre, suivant la technique de P. A. LEVENE (1). Les éthers éthyliques des

1. P. A. LEVENE. The cleavage products of proteoses (*Journ. biolog. Chem.*, 1, 45, 1905). — P. A. LEVENE et G. A. ALSBERG. The cleavage products of vitellin (*Journ. biolog. Chem.*, 2, 127, 1906). — P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE. Hydrolyse von Wittepepton (*Biochem. Zeitschr.*, 13, 440, 1908). — P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE. The Leucin Fraction of Proteids (*Journ. biolog. Chem.*, 6, 391, 1909).

aminoacides sont extraits par l'éther ordinaire, la solution étherée est desséchée par le sulfate de sodium anhydre, le véhicule est chassé par distillation au bain-marie à 30° sous pression réduite, puis le mélange des éthers aminés est fractionné sous une pression de 15 millimètres de mercure.

La fraction qui passe depuis 60° jusque vers 100° (ébullition du bain-marie) est dissoute dans l'éther de pétrole qui laisse insoluble une petite portion où doit se trouver la sérine ; l'éther de pétrole est rapidement chassé sous pression réduite, et le mélange des aminoéthers est additionné d'un grand volume d'eau bouillante dans un ballon à réfrigérant ascendant. L'ébullition dans ce ballon est maintenue pendant deux heures, puis la solution est évaporée à sec au bain-marie. Le produit est débarrassé de la proline par une série d'épuisements par l'alcool absolu bouillant, au Soxhlet, en renouvelant plusieurs fois les surfaces par redissolution dans l'eau.

Le produit, généralement compté comme « leucine » dans les hydrolyses protéiques de E. FISCHER, est en réalité formé essentiellement de leucine, d'isoleucine et de valine, sans compter un peu d'alanine, etc... Pour isoler les divers constituants, j'ai eu recours à la méthode de P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE (1), qui repose sur la précipitation fractionnée, au moyen des sels de plomb, du mélange des aminoacides en solution ammoniacale. « La leucine et l'isoleucine sont précipitées à l'état de $Pb(C_6H_{12}O_2N)_2$ analytiquement purs, quand de l'acétate de plomb normal, en quantité *légèrement supérieure à l'équivalent* de la leucine et de l'isoleucine présentes, est ajouté à la solution ammoniacale chaude du mélange. La valine est récupérée du filtrat, analytiquement pure » (2). On a déterminé au préalable, par dosage d'azote sur le mélange, la proportion respective de la valine et des leucines.

L'opération a donné lieu à quelques modifications de la technique de P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE, modifications dont le détail ne saurait trouver place ici. La valine obtenue a été soumise au dosage de l'azote :

Dosage d'azote. — Méthode Dumas. Substance: 0 gr. 4964. — Azote dégagé : 49 cc. 7 à 14°5 et 767,7 mm. (11°) = 23 mgr, 2174. — N = 41,82 0/0.

1. P. A. LEVENE et D. D. van SLYKE. The Leucin Fraction of Proteids (*Journ. biolog. Chem.*, 6, 391, 1909).

2. « In brief, leucin and isoleucin are precipitated as analytically pure $Pb(C_6H_{12}O_2N)_2$ when M/1 lead acetate, in quantity *slightly more than equivalent* to the leucin and isoleucin present, is added to the hot ammoniacal solution of the mixture. The valin is regained analytically pure from the filtrate. » (*Journ. biolog. Chem.*, vol. 6, p. 394, 1909).

La teneur théorique de la valine en azote est 11,97 0/0 ; celle de la leucine est 10,69 0/0. Si l'on prend pour base d'un calcul, *forcément aléatoire pour des différences aussi minimes et sur lequel influe énormément l'imprécision expérimentale*, on poserait, en appelant x la proportion 0,0 de valine pure contenue dans le mélange, l'équation :

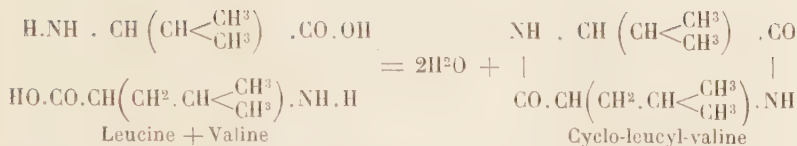
$$\begin{aligned} x \times 11,97 + (100 - x) \times 10,69 &= 100 \times 11,82 \\ x &= 88,2 \\ 100 - x &= 11,8 \end{aligned}$$

L'échantillon contiendrait donc, *si l'on peut en croire ce calcul*, environ 88 0/0 de valine, et 12 0/0 de leucine (avec isoleucine ?).

Un échantillon de cette valine (3 gr.) est placé, avec 4 fois son poids de glycérine (12 gr.) dans le fond d'un tube long d'environ 40 centimètres et disposé verticalement dans l'étuve à air, de telle façon que son extrémité supérieure émerge de l'étuve et puisse être saisie, comme il a été expliqué au chapitre de l'*Action de la glycérine sur la leucine*. Il a été dit alors comment l'on parvient, en saisissant de la main droite l'extrémité du tube, et en le frappant sur le plat de la main gauche protégée par un linge, à imprimer au mélange de réaction les secousses nécessaires pour le brasser et pour faire rentrer au sein de la glycérine chaude l'acide aminé, qui tend constamment à s'en échapper sous forme d'une croûte cristallisée. Le mélange est maintenu pendant 8 heures à la température 170°.

Le lendemain on trouve la masse refroidie, de coloration brun clair, parsemée d'une foule de très fines aiguilles ; la masse est délayée dans l'eau glacée, on essore à la trompe, puis lave encore deux fois les aiguilles par suspension dans l'eau glacée et rapide essorage à la trompe. Les aiguilles sont dissoutes dans l'alcool bouillant, et on cristallise deux fois dans ce solvant. Rendement : 0 gr. 360.

La substance parfaitement blanche, par son insolubilité dans l'eau et par sa facile solubilité dans l'alcool bouillant, par sa propriété de se dissoudre dans l'acide sulfurique concentré et de reprécipiter lorsqu'on verse la solution sulfurique dans un excès d'eau, rappelle de très près les cyclo-leucyl-leucines (leucinimides). Mais elle fond à 260° corr., et donne à l'analyse (Dumas) 13,27 0/0 d'azote. Ce n'est pas le chiffre d'une cyclo-leucyl-leucine, qui en contient 12,39 0/0 ; ce n'est pas celui d'une cyclo-valyl-valine, qui titrerait 14,14 0/0 d'azote. En revanche, le nombre trouvé est extrêmement voisin de la teneur en azote (13,21 0/0) qu'aurait une *cyclo-leucyl-valine* formée par anhydrisation double d'une molécule de leucine et d'une molécule de valine :



Pour être bien sûr néanmoins de ne pas avoir affaire simplement à de la cyclo-valyl-valine (N=14,140/0) souillée de valine (N=11,970/0) non anhydrique et abaissant ainsi la teneur globale en azote, j'ai dissous dans l'acide sulfurique concentré, en chauffant légèrement, tout l'échantillon restant; la solution sulfurique, versée dans un grand excès d'eau, fournit d'abondants flocons blancs, qui sont recueillis, lavés et cristallisés dans l'alcool bouillant. Après ce traitement, la substance fond encore à 260° corr., et donne à l'analyse (Dumas) 13,100/0 d'azote. Il ne faut pas attacher grande importance aux décimales de cette analyse, qui n'a pu être effectuée que sur une prise d'essai minime: néanmoins elle démontre qu'aucun acide libre ne souillait le produit étudié.

Les eaux de lavage de la cyclo-leucyl-valine contiennent, bien entendu, d'autres produits de transformation de la valine, dont l'étude n'a pas sa place au présent chapitre.

Deuxième préparation de cyclo-leucyl-valine. — La deuxième préparation de cyclo-leucyl-valine a été réalisée au moyen d'un nouvel échantillon de valine, extrait lui aussi des produits d'hydrolyse chlorhydrique de la corne de bœuf. L'isolement a été fait par la même méthode que précédemment, sauf quelques nouveaux perfectionnements de détail dans le fractionnement par le plomb, modifications dont l'étude ne saurait trouver place ici. La valine obtenue fondait à 269° corr., et ne peut donc être considérée comme rigoureusement pure, puisque A. KOSSEL et H. D. DAKIN (1) ont trouvé 281°-282° pour la valine obtenue par eux dans l'hydrolyse de la salmine, protamine des testicules de saumon qui constitue un matériel exceptionnellement favorable car elle ne contient pas de leucine. L'analyse de notre nouvel échantillon de valine a donné le chiffre suivant :

Dosage d'azote — Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1974. — Azote dégagé : 20 cc. 3 à 18° et 767,0 mm (19°) = 23 mgr. 4874. — N = 11,900/0.

Si l'on voulait considérer ce chiffre comme répondant rigoureuse-

1. A. KOSSEL u. H. D. DAKIN. Beiträge zum System der einfachsten Eiweisskörper (*Z. physiol. Chem.*, 40, 565, 1904).

ment à la composition de l'échantillon étudié, et baser sur lui un calcul (*extrêmement aléatoire*), on poserait l'équation suivante :

$$x \times 11,97 + (100 - x) \times 10,69 = 100 \times 11,90$$

$$x = 94,5$$

$$100 - x = 5,5$$

On admettrait donc que l'échantillon contenait, à une forte erreur près, environ 95 0/0 de valine et 5 0/0 de leucine.

Une portion de cette valine (3 gr.) a été traitée par 4 fois son poids de glycérine (12 gr.) à 170°, avec la même technique que précédemment. On a obtenu encore des aiguilles insolubles dans l'eau froide, qui après deux cristallisations dans l'alcool bouillant, fondaient également à 260°. Rendement : 0 gr. 291.

Pour éviter toute souillure par un aminoacide libre, l'échantillon pulvérisé a été baigné d'acide chlorhydrique dilué (3 cc. d'acide pur du commerce, étendus à 25 cc.), et abandonné ainsi toute une nuit, puis lavé et séché. Après ce traitement, il fondait encore à 260°, fournissait à l'analyse 13,22 0/0 d'azote (Dumas) et 64,98 0/0 de carbone. Le corps possède donc très exactement la composition d'une cyclo-leucyl-valine.

Troisième préparation de cyclo-leucyl-valine. — Pour vérifier une fois de plus la remarquable tendance des aminoacides, lorsqu'ils sont en mélange, à donner le dipeptide *mixte*, j'ai encore employé un petit échantillon dont la teneur en azote n'avait pas été déterminée, mais que j'avais des raisons de considérer comme formé de valine avec une notable proportion de leucine. Traité par la glycérine à 170° comme à l'ordinaire, ce produit a fourni de fines aiguilles qui après isolement par lavage alcoolique, et une seule recristallisation dans l'alcool bouillant, pesaient 0 gr. 12. Le faible poids de l'échantillon n'a pas permis de lui faire subir d'autre purification : il a été consacré directement au dosage de l'azote, qui a donné N = 13,02 0/0. La substance était donc évidemment encore une cyclo-leucyl-valine.

Propriétés de la cyclo-leucyl-valine. — La substance, d'un blanc pur, cristallise en aiguilles soyeuses très fines au sein de la glycérine ; en aiguilles plus épaisses, par évaporation lente de la solution alcoolique. Ces aiguilles ressemblent beaucoup à celles de la cyclo-leucyl-leucine (leucinimide), au point qu'on pourrait facilement confondre les deux substances d'après leur simple aspect. Le point de fusion a été déterminé toujours en petit tube scellé, au bain d'acide sulfurique

et de bisulfate de K, par immersion des tubes à une température de plus en plus voisine de la fusion (fusion instantanée). Tous les échantillons ont donné le point 260° corr.

La *cyclo-leucyl-valine* est pratiquement insoluble dans l'eau froide, soluble dans l'alcool bouillant, d'où elle cristallise par refroidissement. L'acide sulfurique concentré la dissout lentement à froid, instantanément si l'on chauffe un peu : la solution sulfurique, projetée dans un grand volume d'eau, laisse précipiter la substance sous forme de flocons blancs très finement divisés.

La *cyclo-leucyl-valine* paraît insipide au premier abord, peut-être par insolubilité dans le liquide buccal ; cependant on perçoit un peu plus tard une légère saveur amère.

Analyse centésimale.

I. — Deuxième échantillon, purifié par double cristallisation dans l'alcool, puis lavage prolongé dans HCl étendu.

Substance : 0 gr. 1859. — CO² : 0 gr. 4225. — H²O : 0 gr. 1587. — C = 61,98 0/0. — H = 9,48 0/0.

II. — Premier échantillon, purifié seulement par double cristallisation dans l'alcool.

Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1230. — Azote dégagé : 14 cc. 05 à 17° et 766,6 mm. (18°) = 16 mgr. 3275. — N = 13,27 0/0.

III. — Premier échantillon, purifié par double cristallisation dans l'alcool, puis par dissolution sulfurique.

Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 0525. — Azote dégagé : 5 cc. 9 à 14° et 758,2 mm. (13°) = 9 mgr. 8794. — N = 13,10 0/0.

IV. — Deuxième échantillon, purifié par double cristallisation dans l'alcool, puis lavage prolongé dans HCl étendu.

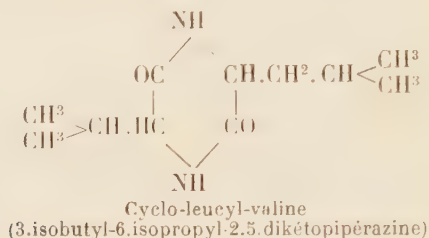
Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 0965. — Azote dégagé : 11 cc. 0 à 13° et 757,5 mm. (14°) = 12 mgr. 7541. — N = 13,22 0/0.

V. — Troisième échantillon cristallisé une seule fois dans l'alcool, sans autre purification.

Méthode Dumas. Substance : 0 gr. 1012. — Azote dégagé : 11 cc. 3 à 15° et 761,5 mm. (14°) = 13 mgr. 1725. — N = 13,02 0/0.

THÉORIE		ANALYSE				
pour C ¹¹ H ²⁰ N ² O ²		I	II	III	IV	V
C ¹¹ = 132	62,26	61,98	—	—	—	—
H ²⁰ = 20	9,43	9,48	—	—	—	—
N ² = 28	13,21	—	13,27	13,10	13,22	13,02
O ² = 32	—	—	—	—	—	—
212	100,00					

Isomérisie des cyclo-leucyl-valines. — Il ne saurait subsister le moindre doute sur la nature de la substance isolée dans toutes ces recherches : il s'agit bien d'une *cyclo-leucyl-valine* (3.isobutyl-6.isopropyl-2.5.dikétopipérazine) :



On sait qu'un tel corps peut exister sous plusieurs variétés stéréoisomères, suivant l'orientation relative, dans l'espace, des groupes substituants isobutyle et isopropyle. Ma nomenclature prévoit 4 isomères individualisés, tous optiquement actifs, susceptibles de se grouper deux à deux, pour constituer deux paires racémiques différentes A et B :

- | | | |
|--------------------|---|--|
| A. Paire racémique | { | Cyclo-d.leucyl-d.valine
Cyclo-l.leucyl-l.valine |
| B. Paire racémique | { | Cyclo-l.leucyl-d.valine
Cyclo-d.leucyl-l.valine |

A ma connaissance, une seule des quatre variétés actives a été préparée jusqu'ici : c'est la *cyclo-l.leucyl-d.valine* (l.leucyl-d.valin-anhydride de E. FISCHER et H. SCHEIBLER (1). Le chlorure de d.α-bromisocaproyle est copulé avec la d.valine en solution sodique ; la d.α-bromisocapronyl-d.valine qui en résulte est transformée, par l'ammoniaque aqueuse concentrée, en l.leucyl-d.valine ; le dipeptide, transformé par éthérification en chlorhydrate de l.leucyl-d.valinate de méthyle, est abandonné en solution méthylique saturée d'ammoniaque à 0°. L'anhydride se sépare très lentement : on le recueille au bout d'une semaine. Le corps cristallise en fines aiguilles microscopiques qui fondent vers 282° corr. en un liquide faiblement coloré. Il est insoluble dans l'eau, soluble dans 40 fois son volume d'alcool chaud ; le meilleur dissolvant est l'acide acétique glacial. Cette solution acétique a servi à prendre le pouvoir rotatoire, dont la valeur, un peu variable suivant la pureté des fractions recueillies, a oscillé entre $[\alpha]_D^{25} = -46^{\circ}5$ et $[\alpha]_D^{25} = -50^{\circ}2$.

1. E. FISCHER. Synthese von Polypeptiden. E. FISCHER u. H. SCHEIBLER. Derivate der activen Valine (*Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 363, 136, 1908).

Il est évident que ma *cyclo-leucyl-valine*, qui fond très nettement à 260° corr., est différente de celle de E. FISCHER et H. SCHEIBLER, dont le point de fusion est plus élevé de 22°. Etant donnée sa formation à haute température, et par analogie avec ce qui se passe dans les cas du même genre, il est bien probable qu'il s'agit d'un *racémique*.

Conclusions. — Le cyclodipeptide mixte se forme lorsqu'on maintient au sein de la glycérine à 170° un mélange de leucine et de valine. Si l'on compare l'ordre de grandeur de la proportion de leucine dont on pouvait soupçonner la présence dans mes échantillons de valine incomplètement purs, et l'ordre de grandeur des rendements en cyclo-leucyl-valine, on voit qu'ils sont les mêmes, c'est-à-dire que la petite quantité de leucine présente a dû se transformer intégralement en cyclo-leucyl-valine. Peut-être cette circonstance pourrait-elle servir à débarrasser la valine des dernières traces de leucine, quitte à régénérer la valine pure de l'anhydride qu'elle peut former en même temps pour son compte.

La formation du cyclodipeptide mixte comporte encore un autre enseignement, auquel j'ai fait allusion déjà dans le chapitre consacré à l'*Action de la glycérine sur la leucine*. Dans la revision que j'ai faite à cette occasion de toutes les observations connues de leucinimide, j'ai réussi à identifier, aux diverses variétés stéréochimiques possibles, tous les échantillons de leucinimide signalés, sauf un, celui que R. COHN (1) a obtenu en chauffant dans un courant de gaz HCl sec la leucine *naturelle* provenant de la caséine. Cette leucinimide de R. COHN fond à 262°, alors que le produit racémique de E. FISCHER et de L. C. MAILLARD fond à 271° : l'écart est trop considérable pour être négligé.

Mais la leucine de R. COHN était *certainement* accompagnée de valine. S'il s'est formé dans la réaction une cyclo-leucyl-valine, il est *certain* que R. COHN n'a pu l'éliminer ni par lavage aqueux, ni par cristallisation alcoolique, ni même par dissolution sulfurique. Un tel mélange a donc produit l'abaissement du point de fusion, et cela sans que la composition centésimale de l'ensemble ait pu différer de celle de la leucinimide, dans une mesure appréciable à l'analyse.

Ainsi s'explique la dernière anomalie et disparaît la dernière incertitude que l'on aurait pu rencontrer dans ma revision des leucinimides.

1. R. COHN. Ueber Bildung von Basen aus Eiweiss (*Z. physiol. Chem.*, 29 283, 1900).

QUATRIÈME PARTIE

ACTION DES SUCRES SUR LES ACIDES α -AMINÉS

(Formation des matières humiques et mélanoidiques)

CHAPITRE XVIII

ACTION DU d.GLUCOSE SUR LE GLYCOCOLLE

But de la recherche. — Mes études relatives à l'action de la glycérine sur les acides aminés m'ont conduit, comme on l'a vu, à penser que la glycérine agit sur ces acides en tant qu'alcool, et que l'enchaînement peptidique des aminoacides, constatation finale de l'expérience, doit reposer sur la formation préalable d'un glycéride instable, c'est-à-dire sur l'éthérification du carboxyle des aminoacides par les fonctions alcooliques de la glycérine.

Si cette manière de voir est exacte, c'est-à-dire si ma méthode de synthèse des polypeptides repose bien sur l'extension au triol glycérine de la réaction découverte autrefois par TH. CURTIUS (1) sur les alcools simples méthylique et éthylique, cette réaction doit pouvoir se généraliser complètement et s'étendre à toute une série d'alcools, simples ou complexes.

L'importance des notions biologiques qui découlent de ma méthode de synthèse des polypeptides m'a déterminé à étudier tout d'abord un alcool complexe qui partage avec la glycérine le privilège d'une diffusion universelle dans le monde des êtres vivants, je veux dire le *d.glucose*.

Ici le problème se complique de cette circonstance que le glucose ne possède pas seulement des fonctions alcooliques, mais aussi une fonction aldéhyde susceptible de masquer le rôle des précédentes, car son intervention est, on le sait, prédominante dans les réactions les plus connues du glucose, depuis les réactions réductrices jusqu'à la formation des osazones et d'autres dérivés spécifiques. Il était donc nécessaire d'examiner :

1. TH. CURTIUS. Ueber das Glycocol (Vorläufige Mittheilung) (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 16, 753, 1883).

1° Si la fonction aldéhyde du d.glucose détermine des réactions spéciales de ce corps avec les acides aminés ;

2° Si, malgré l'intervention probable de la fonction aldéhyde, il est possible de mettre en évidence une réaction propre des fonctions alcooliques, parallèle ou non à celle des fonctions alcooliques de la glycérine.

Tel est le but des recherches qui vont être décrites ; elles ont été instituées en employant successivement le glucose en excès, puis en déficit moléculaire vis-à-vis du glyocolle.

I. — ACTION DU d.GLUPOSE EN EXCÈS SUR LE GLYCOLLE

Réaction du d.glucose sur le glyocolle à 100°, en milieu aqueux. — Le poids moléculaire du glyocolle étant 75, et celui du glucose anhydre 180, pour réaliser un mélange équimoléculaire il faudrait prendre, pour 1 partie de glyocolle, 2,4 parties de glucose. En prenant 4 parties de glucose, on aura un large excès de ce dernier corps et la certitude que le glyocolle en totalité trouvera en face de lui le groupement aldéhydique en quantité suffisante pour que la réaction éventuelle puisse mettre en jeu exclusivement ce groupe aldéhydique.

Voici le phénomène initial que j'ai constaté (1) et que chacun peut reproduire aisément. Dans un tube on place 1 gr. de glyocolle pur, 4 gr. de glucose pur (anhydre, cristallisé dans l'alcool) et 3-4 cc. d'eau ; cette quantité de liquide est suffisante pour dissoudre les corps pulvérisés, lorsqu'on place le tube au bain-marie. Mais à peine la dissolution est-elle effectuée, qu'on voit bientôt le mélange prendre une légère teinte jaunâtre, nettement perceptible en général après une dizaine de minutes de séjour sur le bain-marie. La coloration s'accroît de minute en minute avec une vitesse croissante, et le mélange devient brun foncé, en même temps qu'il prend une consistance un peu plus épaisse. On voit alors se dégager de fines bulles gazeuses qui forment mousse et vacuolisent la masse ; si bien que si, en s'abstenant d'ajouter de l'eau, on laisse ce mélange se dessécher, on obtient finalement une masse spongieuse, volumineuse, formée de lamelles sèches et brillantes, d'un brun noir. Si on prend soin de remettre un peu d'eau avant la

1. L.-C. MAILLARD. Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique (*C. R. Acad. Sc.*, 154, 66, 1912).

dessiccation totale, le dégagement gazeux se poursuit pendant longtemps, et il reste finalement un produit brun-noir, amorphe, en grande partie insoluble dans l'eau, et sur la nature duquel on reviendra plus loin.

Réaction du d.glucose sur le glyocolle vers 150°, en milieu aqueux. — On vient de voir que la réaction se poursuit rapidement déjà dans un vase placé sur le bain-marie, où la température ne dépasse jamais et n'atteint que rarement 100°.

Lorsqu'on veut opérer comme dans le cas de la glycérine, c'est-à-dire placer le mélange dans une étuve dont la température sera élevée progressivement jusqu'à 170°-175°, on ne parvient pas à conduire la réaction jusqu'à cette température. A peine l'étuve a-t-elle atteint 130°, 140°, 150° au plus, qu'on voit la réaction devenir violente, s'emballer; le dégagement gazeux devient si abondant et si rapide que toute la masse se boursoufle en un volumineux champignon qui fait éruption hors des vases à réaction, et qu'il est impossible de contenir.

Réaction du d.glucose sur le glyocolle à 40°. — Violente vers 140°-150°, la réaction est encore rapide vers 80-100°. La vitesse de réaction diminue fortement quand la température baisse, mais il était intéressant de rechercher jusqu'à quel degré il faut descendre cette température pour que la vitesse devienne infiniment faible et la réaction pratiquement nulle.

Il est très aisé d'observer la réaction, dans ses premiers stades au moins, à l'aide d'une étuve réglée à 40°. Par exemple, en dissolvant, dans 3 cc. d'eau, 0 gr. 5 de glyocolle, puis ajoutant 2 gr. de glucose pulvérisé, et agitant de temps à autre pour dissoudre le sucre, on n'observe encore aucune coloration après 20 heures de séjour à 40°; mais vers la 27^e heure on constate déjà une légère teinte jaunâtre. Voici les observations successives que l'on peut faire :

Après 20 heures à 40°. Rien.

» 27	»	Jaune naissant.
» 44	»	Orangé foncé.
» 68	»	Brun clair, nombreuses petites bulles.
» 87	»	Brun foncé, nombreuses bulles.
» 110	»	Brun foncé, abondante vacuolisation,

La réaction s'arrête d'elle-même par la dessiccation du mélange placé dans l'étuve; elle reprend si on ajoute de nouveau un peu d'eau, puis s'arrête, etc. On peut de la sorte éliminer tout le gaz libérable, et

même arriver jusqu'à l'obtention des masses brunes insolubles, mais il faut pour cela des semaines.

La réaction se poursuit donc à 40° exactement comme aux températures plus élevées, à la vitesse près.

Réaction du d. glucose sur le glyocolle à 34°. — Enfin j'ai reproduit la réaction dans une étuve réglée à 34°. Dans 3 cc. d'eau on dissout 0 gr. 5 de glyocolle, puis on ajoute 2 gr. de glucose pulvérisé, et on agite de temps en temps pour la dissolution du sucre. Voici les premières constatations :

Après	20 heures à 34°.	Rien.
»	27	» Rien.
»	35	» Rien.
»	44	» Jaune pâle.
»	68	» Jaune orangé.
»	87	» Teinte madère.
»	110	» Brun clair.
»	165	» Brun accentué.
»	204	» Brun foncé. Bulles assez nombreuses.

La réaction n'a donc lieu à 34° qu'avec une extrême lenteur. Mais elle se produit néanmoins automatiquement et régulièrement, et c'est là une notion que nous retrouverons lorsque nous aurons à envisager des phénomènes naturels dans lesquels l'influence du temps a tout loisir de s'exercer.

Nature du dégagement gazeux : anhydride carbonique. —

Pour reconnaître la nature du gaz dégagé, que l'on soupçonne être du gaz carbonique, le tube large où se passe la réaction est muni d'un bouchon de caoutchouc portant deux tubes, dont l'un plonge jusque vers le fond et l'autre part de la région supérieure. Le tube plongeant amène de l'air qui a d'abord circulé dans un laveur Villiers à potasse, puis sur des fragments de potasse. Le tube abducteur conduit le gaz dans un laveur de Cloesz garni d'eau de baryte, et le tout est relié à une trompe qui produit un lent courant d'air.

Le vase à réaction est entouré d'un bain d'eau que l'on porte jusque vers l'ébullition : le mélange de sucre et d'acide commence à se colorer. Lorsqu'il est devenu brun, on voit l'eau de baryte commencer à se troubler, puis se remplir d'un abondant précipité de carbonate, en même temps que le mélange de réaction prend l'aspect mousseux habituel.

Origine du gaz carbonique. — Sous la forme qui vient d'être indiquée, l'expérience montre un mélange aqueux de sucre et d'acide aminé, qui paraît recevoir l'air atmosphérique et rejeter de l'anhydride carbonique. Mais il ne faut pas se hâter d'attribuer à l'air l'origine de l'oxygène contenu dans l'anhydride carbonique. Trois hypothèses peuvent être faites sur l'origine de CO^2 .

1^o Le dégagement de CO^2 serait simplement dû à la rupture du groupement carboxyle contenu dans l'acide aminé, phénomène fréquent comme on le sait.

2^o Le gaz CO^2 emprunterait son carbone à des chaînons du glucose ou du glycolle, autres que le carboxyle, et son oxygène aux fonctions oxygénées du sucre.

3^o Le gaz CO^2 emprunterait son carbone à des chaînons du glucose ou du glycolle, autres que le carboxyle, et son oxygène à l'air atmosphérique.

Le choix entre ces trois hypothèses a été décidé par les expériences suivantes.

Essais de dosage de CO^2 dégagé dans un courant d'oxygène — Le petit vase à réaction reçoit les substances réagissantes en quantité exactement connue, c'est-à-dire 1 gr. 0020 de glycolle pur et 4 gr. 0348 de glucose (anhydre, cristallisé dans l'alcool), avec 5 cc. d'eau. Ce vase à réaction (tube cylindrique à fond plat de 30 mm. de diamètre et 10 cm. de hauteur), muni de son bouchon de caoutchouc à deux tubes, est placé dans un vase de Bohême de 750 cc. rempli d'une solution de chlorure de calcium qui permettra d'élever commodément la température sans être gêné par l'émission de vapeur. Un courant d'oxygène venant d'un gazomètre traverse un laveur Villiers à potasse, puis un laveur à acide sulfurique, enfin un grand tube en U garni de potasse en fragments, et arrive dans le vase-laboratoire. A la sortie le gaz passe dans un grand tube en U à ponce sulfurique, puis dans un tube en U à ponce sulfurique du modèle employé dans les combustions et qu'on pèse pour contrôle, enfin dans un tube à potasse de Liebig et dans un petit tube en U garni de potasse et de ponce sulfurique. L'augmentation de poids de ces deux derniers tubes donne le poids de CO^2 , comme dans les combustions.

Le vase-laboratoire est maintenu vers 120°-125° pendant 8 heures, mais la réaction est arrêtée au moins depuis la 6^e heure, par dessiccation complète, aucun dispositif n'ayant été installé pour le renouvellement de l'eau. Le petit tube protecteur à ponce sulfurique n'ayant augmenté que de 0 gr. 0018, on peut considérer que l'arrêt d'eau a bien

fonctionné; la quantité de CO^2 recueillie est $0,2455 + 0,0367 = 0 \text{ gr. } 2822$. Or on calcule que la quantité de glyocolle mise en réaction, $1 \text{ gr. } 0020$, renfermait $0 \text{ gr. } 5878$ de CO^2 préformé sous forme carboxyle : la quantité de CO^2 recueillie dans les absorbeurs n'atteint donc pas tout à fait la moitié de ce qu'aurait pu fournir la scission pure et simple du carboxyle appartenant au glyocolle.

Des expériences du même genre ont été renouvelées plusieurs fois, avec diverses modifications, et notamment avec l'adjonction d'un dispositif qui permet, sans ouvrir l'appareil, d'introduire à volonté, dans le vase-laboratoire, une petite quantité d'eau destinée à remplacer celle qui s'évapore et qu'entraîne le courant gazeux. La réaction peut ainsi être prolongée aussi longtemps qu'on le désire; mais jamais je ne suis arrivé, après la durée de chauffe que comporte une journée de travail (une dizaine d'heures en pleine marche) à recueillir une quantité d'anhydride carbonique égale à celle que pouvait fournir, par simple scission du carboxyle, la quantité de glyocolle mise en œuvre.

Rien dans ces recherches ne permettait donc d'admettre que CO^2 provînt d'un autre atome de carbone que celui du carboxyle, et l'on doit reconnaître que ce type d'expériences ne permet pas d'élucider l'origine de l'anhydride carbonique, au moins lorsqu'on ne les prolonge que pendant une seule journée, pour éviter d'abandonner trop longtemps les tubes absorbeurs aux causes accidentelles de variation qui pourraient les influencer.

Dégagement de CO^2 en atmosphère limitée d'oxygène. — Je me suis donc trouvé conduit à disposer autrement l'expérience pour rechercher si l'oxygène gazeux intervient ou non dans le dégagement d'anhydride carbonique et dans la production des matières noirâtres.

On choisit une cloche cylindrique (23 mm. de diamètre et 23 cm. de hauteur) terminée en calotte sphérique, que l'on remplit en grande partie de mercure, en ménageant l'espace nécessaire pour y verser le mélange sirupeux de glyocolle, de sucre et d'eau, que l'on vient de préparer d'autre part. En versant encore quelques gouttes de mercure, on détermine l'affleurement du mélange sirupeux, de telle sorte qu'en obturant la cloche par une plaque de verre ou simplement par la paume de la main, on peut la retourner sur la cuve à mercure en évitant l'introduction de toute bulle d'air. On y fait alors passer une certaine quantité d'oxygène pur, dont on vient de mesurer exactement le volume (humide) en notant la température et la pression barométrique.

La cloche ainsi chargée est transportée sur une cuve profonde consti-

tuée simplement par une cloche plus large (37 mm. de diamètre et 20 cm. de hauteur), retournée et remplie de mercure. Le tout est enfin immergé dans une marmite pleine d'eau et placée sur un réchaud à gaz qui permet de porter l'eau à l'ébullition. On voit bientôt le mélange sirupeux brunir, en même temps que le volume gazeux contenu dans la cloche augmente peu à peu : le gaz emprisonné finirait par s'échapper en débordant la cloche, si on n'arrêtait à temps le chauffage du bain. On laisse refroidir, transporte la cloche sur la grande cuve à mercure, décante le gaz à l'aide d'une pipette Salet pour éviter que la présence du mélange organique puisse introduire des causes d'erreur lors du traitement par la potasse, puis on procède à l'analyse des gaz en les traitant successivement par la potasse et par le pyrogallol.

Expérience 1. — Le mélange sirupeux introduit dans la cloche contient environ 0 gr. 5 de glycocolle, 2 gr. de glucose, et 1 cc. 5 d'eau. On y fait passer 15 cc. 6 d'oxygène mesuré humide à 14° et 761,7 mm. (17°), soit 14 cc. 6 d'oxygène calculé sec à 0° et 760 mm. Après 6 heures de séjour à 100°, le mélange étant devenu épais et noirâtre, on trouve dans la cloche 38 cc. 7 de gaz humide, mesuré à 16° et 752,9 mm. (17°5), c'est-à-dire 35 cc. 5 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Après absorption par la potasse, il reste 13 cc. 7 de gaz mesuré humide à 16° et 752,9 mm. (17°5), soit 12 cc. 6 de gaz calculé sec à 0° et 760 mm. Ce gaz est tout entier de l'oxygène, car il est intégralement absorbé par le pyrogallol en présence de potasse, sauf une très fine bulle qui doit être considérée, comme d'ordinaire, comme un peu d'oxyde de carbone formé aux dépens du pyrogallol. Le bilan de l'expérience est donc le suivant :

O ² introduit :	14 cc. 6
O ² retrouvé :	12 cc. 6
O ² disparu :	2 cc. 0
CO ² produit :	22 cc. 9

Expérience 2. — Le mélange introduit dans la cloche contient environ 0 gr. 5 de glycocolle, 2 gr. 0 de glucose, et 1 cc. 5 d'eau. On y fait passer 12 cc. 9 d'oxygène mesuré humide à 15° et 763,8 mm. (16°), soit 12 cc. 05 d'oxygène calculé sec à 0° et 760 mm. Après 4 heures de séjour à 100°, le mélange étant devenu brun-noirâtre et assez épais, on trouve dans la cloche 21 cc. 9 de gaz mesuré humide à 16° et 768,3 mm. (17°), soit 20 cc. 5 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Après absorption par la potasse, il reste 11 cc. 15 de gaz mesuré humide à 16° et 768,3 mm. (17°), soit 10 cc. 45 de gaz calculé sec à 0° et 760 mm. Ce gaz est tout entier de l'oxygène, car il est intégralement absorbé par

le pyrogallol en présence de potasse, sauf une fine bulle qui doit être un peu de CO formé aux dépens du pyrogallol. Voici le bilan de l'expérience :

O² introduit : 12 cc. 05
O² retrouvé : 10 cc. 45
O² disparu : 1 cc. 6
CO² produit : 10 cc. 05

On constate dans ces expériences la disparition d'une petite quantité d'oxygène (2 cc. 0 et 1 cc. 6), qui n'est pas tout à fait négligeable et ne résulte pas d'un accident de manipulation. Peut-être une partie de cet oxygène reste-t-elle en dissolution dans la masse sirupeuse, qui a eu tout loisir de s'en saturer. Peut-être aussi l'oxygène intervient-il, mais d'une manière tout accessoire, dans quelque réaction secondaire qui viendrait accompagner les phénomènes principaux du dégagement de CO² et de la formation des matières noirâtres. Une chose est certaine : il ne saurait être question de chercher dans l'oxygène gazeux la source de l'oxygène contenu dans le gaz carbonique, dont la production abondante est tout à fait hors de proportion avec la minime quantité d'oxygène disparue.

Ces conclusions sont entièrement corroborées par la réaction du glucose sur le glycolle en présence d'une atmosphère d'azote.

Dégagement de CO² en atmosphère limitée d'azote. — L'expérience est montée exactement comme dans le cas de l'oxygène, et avec les mêmes appareils. L'azote était produit par la décomposition à chaud d'un mélange équimoléculaire de nitrite de sodium et de chlorure d'ammonium en solution aqueuse, traversait des laveurs à potasse, et s'emmagasinait dans un gazomètre. En vue de sa purification, il était ensuite conduit à travers deux laveurs garnis de pyrogallol en solution potassique, puis dans un laveur à acide sulfurique, ensuite dans un long tube garni de cuivre réduit (toile de cuivre) chauffé au rouge, enfin dans un grand tube en U rempli de potasse en fragments, et recueilli sur le mercure dans des flacons dont les parois internes étaient humectées d'eau bouillie.

Expérience 1. — La cloche où aura lieu la réaction est d'abord retournée l'ouverture en haut, remplie de mercure, et chauffée à 100° pendant 2 heures sous une légère couche d'eau pour chasser autant que possible les bulles d'air qui adhéreraient aux parois. On prépare un mélange de 0 gr. 5 de glycolle, 2 gr. 0 de glucose, 1 cc. 5 d'eau fraîchement bouillie, et après dissolution on place dans le vide pendant

2 heures pour éliminer le plus possible l'air dissous. On verse le sirop dans la cloche à mercure, où on a réservé l'espace nécessaire, et on retourne aussitôt la cloche sur la cuve à mercure. On y fait passer 12 cc. 5 d'azote pur mesuré humide à 15° et 756,4 mm. (17°), soit 11 cc. 55 d'azote supposé sec à 0° et 760 mm. On maintient la cloche ainsi chargée sur la cuve à mercure, en dépression, pendant 24 heures, pour permettre à l'oxygène qui serait encore dissous dans le liquide sirupeux, de diffuser dans l'atmosphère de la cloche : le liquide de réaction ne renfermera plus que des traces insignifiantes d'oxygène.

Après 3 heures environ de chauffage à 100°, *le mélange a bruni aussi fortement qu'en présence de l'oxygène*. On retire de la cloche 25 cc. 05 de gaz mesuré humide à 14° et 757,6 mm. (15°), soit 23 cc. 25 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Après absorption par la potasse, il reste 12 cc. 45 de gaz mesuré humide à 14° et 757,6 mm. (15°), soit 11 cc. 55 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Ce gaz résiduel est bien de l'azote pur, car en introduisant une solution de pyrogallol, puis de la potasse, le pyrogallol prend à peine une très légère teinte jaunâtre insignifiante. Voici donc le bilan de l'expérience :

N² introduit : 11 cc. 55
 N² retrouvé : 11 cc. 55
 N² disparu : 0 cc. 0
 CO² produit : 11 cc. 7

Expérience 2. — L'expérience est disposée exactement comme la précédente, avec les mêmes précautions pour éliminer autant que possible l'air dont la présence pourrait venir compliquer les phénomènes. La cloche a été garnie par un mélange de 0 gr. 5 de glyocolle avec 2 gr. 0 de glucose et 1 cc. 5 d'eau. On y fait passer 11 cc. 9 d'azote pur mesuré humide à 15° et 761,4 mm. (17°), soit 11 cc. 05 d'azote supposé sec à 0° et 760 mm.

Le chauffage dure 5 heures environ : *le mélange a bruni aussi fortement qu'en présence de l'oxygène*. Après refroidissement, on retrouve dans la cloche 32 cc. 55 de gaz mesuré humide à 15° et 754,3 mm. (16°), soit 30 cc. 0 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Après absorption par la potasse, il reste 11 cc. 9 de gaz mesuré humide à 15° et 754,3 mm. (16°), soit 11 cc. 0 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Ce gaz résiduel est de l'azote pur, ainsi qu'on s'en assure en introduisant une solution de pyrogallol puis de la potasse. Voici donc le bilan de l'expérience :

N² introduit : 11 cc. 05
 N² retrouvé : 11 cc. 0
 N² disparu : 0 cc. 05
 CO² produit : 19 cc. 0

On voit que dans cette expérience comme dans la précédente la concordance analytique est excellente, du moins si l'on accepte comme limite des erreurs expérimentales le demi-dixième de centimètre cube, ce qui paraît raisonnable.

Les expériences en atmosphère d'azote viennent donc se joindre aux expériences en atmosphère d'oxygène, pour prouver que l'oxygène n'intervient nullement, ni dans le dégagement d'anhydride carbonique, ni dans la formation des matières brunes, car le produit présente exactement le même aspect final, quel que soit le gaz en présence duquel on ait opéré.

Enfin, pour apporter une base plus solide encore à ces conclusions, je décrirai encore des essais du même genre exécutés dans une atmosphère d'hydrogène pur.

Dégagement de CO_2 en atmosphère limitée d'hydrogène.—

L'expérience est montée exactement comme dans le cas de l'oxygène ou de l'azote, avec les mêmes appareils. L'hydrogène était produit par la réaction de l'acide sulfurique pur (commercial) étendu sur le zinc pur (commercial) en présence d'une trace de sulfate de cuivre ; le gaz traversait un laveur à potasse, et s'emmagasinait dans un gazomètre. L'hydrogène traversait ensuite un laveur à acide sulfurique, un long tube garni de cuivre réduit (toile de cuivre) chauffé au rouge, enfin un grand tube en U garni de potasse en fragments, et arrivait sur la cuve à mercure. Lorsque l'appareil était parfaitement purgé d'air par un dégagement de plusieurs heures, l'hydrogène pur était recueilli sur le mercure dans des flacons dont les parois internes étaient humectées d'eau bouillie.

Expérience 1. — L'expérience est disposée comme dans le cas de l'azote, avec les mêmes précautions pour éviter autant que possible l'intervention de l'air. La cloche est garnie par un mélange de 0 gr. 5 de glycocolle avec 2 gr. 0 de glucose et 4 cc. 5 d'eau. On y fait passer 10 cc. 3 d'hydrogène pur mesuré humide à 15° et 750,5 mm. (15°), soit 9 cc. 45 d'hydrogène supposé sec à 0° et 760 mm.

Le chauffage dure 4 heures environ, et le mélange de sucre et d'acide aminé brunit exactement comme dans le cas de l'oxygène ou de l'azote. Après refroidissement, on retrouve dans la cloche 26 cc. 45 de gaz humide à 13° et 758,5 mm. (13°), soit 24 cc. 8 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Après absorption par la potasse, il reste 10 cc. 15 de gaz mesuré humide à 13° et 758,5 mm. (13°), soit 9 cc. 5 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Ce gaz est de l'hydrogène exempt d'oxygène, ainsi qu'on s'en

assure en introduisant un peu de pyrogallol en solution puis de la potasse. Voici donc le bilan de l'expérience :

H ² introduit :	9 cc. 45
H ² retrouvé :	9 cc. 5
H ² disparu :	— 0 cc. 05
CO ² produit :	45 cc. 3

Expérience 2. — L'expérience est disposée et conduite comme la précédente. La cloche est garnie par un mélange de 0 gr. 5 de glyco-colle avec 2 gr. 0 de glucose et 1 cc. 5 d'eau. On y fait passer 9 cc. 2 d'hydrogène pur mesuré humide à 13° et 758,9 mm. (15°), soit 8 cc. 6 d'hydrogène supposé sec à 0° et 760 mm.

Le chauffage dure 4 heures environ, et le mélange brunit exactement comme en présence de l'oxygène ou de l'azote. Après refroidissement, on retrouve dans la cloche 27 cc. 75 de gaz mesuré humide à 15° et 764,6 mm. (14°5), soit 26 cc. 15 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. Après absorption par la potasse, il reste 9 cc. 2 de gaz mesuré humide à 15° et 764,6 mm. (14°5), soit 8 cc. 65 de gaz supposé sec à 0° et 760 mm. En introduisant un peu de solution de pyrogallol, puis de la potasse, on n'observe pas de coloration : le résidu gazeux est donc exempt d'oxygène. On aurait le bilan suivant :

H ² introduit :	8 cc. 6
H ² retrouvé :	8 cc. 65
H ² disparu :	— 0 cc. 05
CO ² produit :	17 cc. 5

Dans cette expérience comme dans la précédente, le volume gazeux non absorbable par KOH paraît avoir *augmenté* de 0 cc. 05, quantité infime, de l'ordre des erreurs expérimentales, et qui n'a peut-être aucune signification. Cependant le fait que ce très minime écart a été constaté dans le même sens pour les deux expériences en atmosphère d'hydrogène, m'a engagé à recourir à l'analyse eudiométrique du gaz résiduel.

Le résidu gazeux occupant 9 cc. 2 (chiffre non corrigé) a été additionné de 5 cc. 8 d'oxygène pur ; après explosion, il restait 1 cc. 65 de gaz ne troublant pas l'eau de baryte, ne contenant donc pas de CO² et indiquant l'absence de gaz carbonés dans le résidu étudié. La diminution de volume par l'explosion était : 9 cc. 2 + 5 cc. 8 — 1 cc. 65 = 13 cc. 35, un tiers de ce volume, soit 4 cc. 45 représentant l'oxygène consommé, et les deux autres tiers, 8 cc. 90, représentant l'hydrogène. Il se pourrait donc que le résidu gazeux du chauffage dans la

cloche eût contenu, outre l'hydrogène, 9 cc. 2 — 8 cc. 9 = 0 cc. 3 de gaz étranger. Ce gaz étranger, n'étant pas un gaz carboné (puisqu'il ne fournit pas de CO^2) serait-il un peu d'azote ? Je m'abstiendrai de toute affirmation, ne pouvant me fier à une seule expérience que je n'ai pas cru devoir répéter, pour ne pas me laisser entraîner trop loin du sujet principal de mes recherches.

S'il faut ajouter foi à cette unique analyse eudiométrique, on aurait donc en réalité le bilan que voici :

H^2 introduit :	8 cc. 6
H^2 retrouvé :	8 cc. 35
H^2 disparu :	0 cc. 25
CO^2 produit :	17 cc. 5
Gaz étranger produit :	0 cc. 3

Quelle que soit la signification réelle du petit écart analytique 0 cc. 3, on voit qu'elle ne saurait influer en rien sur l'interprétation des phénomènes principaux.

Ces expériences en atmosphère d'hydrogène, où l'on voit le mélange aqueux de sucre et d'acide aminé brunir fortement, et le gaz carbonique se dégager comme en présence de l'oxygène ou de l'azote, prouvent à nouveau que l'oxygène gazeux n'intervient dans aucun de ces deux phénomènes. On en trouverait, s'il le fallait, encore une preuve dans le dégagement de CO^2 et la formation des produits bruns en l'absence de toute atmosphère.

Dégagement de CO^2 en l'absence de toute atmosphère. — Ici encore l'expérience est exécutée avec le même appareil qui a servi pour l'étude de la réaction en atmosphère d'oxygène, d'azote, ou d'hydrogène. La cloche est garnie par le mélange sirupeux obtenu avec 0 gr. 5 de glyocolle, 2 gr. 0 de glucose et 1 cc. 5 d'eau. On constate qu'il n'existe aucune bulle gazeuse à la convexité de la cloche.

En chauffant alors à la manière ordinaire, on voit se dégager de fines bulles gazeuses qui se rassemblent à la partie supérieure de la cloche, en même temps que le liquide brunit comme dans les essais précédents. Après 5 heures de chauffe, et refroidissement, on recueille 16 cc. 8 de gaz (mesuré humide à 15^0 et 756.9 mm.), dont l'absorption par la potasse est intégrale, et qui est donc de l'anhydride carbonique pur.

Cette expérience a été répétée plusieurs fois : inutile d'y insister.

Bilan élémentaire de la réaction du glucose et du glyco-

colle. — Toutes les expériences qui viennent d'être décrites concordent pour montrer que l'anhydride carbonique qui se dégage n'emprunte pas son oxygène à l'atmosphère ; il reste à rechercher si cet oxygène provient des fonctions du glucose, ou du carboxyle du glyco-colle. Il m'a semblé que cette question serait éclairée, en même temps que les phénomènes corrélatifs, par une étude quantitative des destinées de chacun des éléments chimiques inclus dans le mélange.

Le mélange employé pour l'expérience comprenait 0 gr. 4993 de glyco-colle pur et 2 gr. 0044 de glucose pur (anhydre, cristallisé dans l'alcool), ce qui, au point de vue de chacun des éléments C, H, O, N, contenus dans les substances solides mises en œuvre, donne les totaux suivants :

	Dans le glyco-colle	Dans le glucose	Total
Carbone	0 gr. 4598	0 gr. 8018	0 gr. 9616
Hydrogène	0 0333	0 1337	0 1670
Oxygène	0 2130	1 0689	1 2819
Azote	0 0932	—	0 0932

Telle est la composition élémentaire du mélange qui est introduit, avec 3 cc. d'eau, dans un petit vase cylindrique entouré d'un bain de chlorure de calcium. Le bouchon de caoutchouc du vase cylindrique porte trois tubulures : la première, plongeant jusque vers le fond, amène un courant d'oxygène pur ; la seconde, partant de la région supérieure, sert de dégagement. Quant à la troisième tubulure, centrale, elle est surmontée d'un caoutchouc avec pince à vis qui la réunit à une boule pleine d'eau sur laquelle une dérivation avec un jeu de pinces permet de faire porter à volonté la pression du courant d'oxygène. On peut ainsi, à tout moment, faire tomber dans le mélange en réaction autant de gouttes d'eau que l'on veut, pour empêcher la dessiccation de venir arrêter la réaction, et cela sans ouvrir l'appareil.

A la sortie du vase-laboratoire, les gaz débouchent d'abord tout près de la surface d'une couche d'acide sulfurique disposée dans un flacon conique à large base, couche d'acide qui absorbe une partie de la vapeur d'eau ; puis il traversent un grand tube en U garni de ponce sulfurique en gros fragments : ces pièces de l'appareil ne sont pas pesées. Les gaz passent alors dans un tube en U à ponce sulfurique, du modèle usité dans les combustions, et qu'on pèse pour contrôle, puis dans un tube à potasse de Liebig, enfin dans un petit tube en U garni

de potasse en fragments et de ponce sulfurique, comme pour une combustion.

Le vase-laboratoire est maintenu pendant 7 heures vers 112° (entre 108° et 115°) dans un lent courant d'oxygène ; on enlève alors le bain de chlorure de calcium, sans toucher à l'appareil, et on continue le balayage par courant d'oxygène pendant le refroidissement, pendant 2 heures $1/2$ environ. On constate alors que le petit tube à ponce sulfurique n'a augmenté que de 0 gr. 0013, ce qui permet de considérer l'arrêt d'eau comme ayant bien fonctionné. Le tube de Liebig a augmenté de 0 gr. 0904, et le dernier tube en U de 0 gr. 0144, ce qui donne 0 gr. 1048 de CO^2 .

D'autre part le vase-laboratoire, après refroidissement complet, a été placé dans le vide sur H^2SO^4 à la température du laboratoire, qui était inférieure ou au plus égale à 15° . Après 48 heures le résidu noirâtre pesait 1 gr. 8810 : on pouvait admettre que l'eau, en petite quantité d'ailleurs, étaient complètement éliminée.

Persistence de la réaction à basse température. — Malgré cela le résidu a continué à perdre du poids dans le vide : voici un tableau qui indique, pour les premiers jours, ces pertes de poids en valeur absolue, ainsi que leur importance centésimale par rapport au poids du résidu après les 2 premiers jours de vide, 1 gr. 8810, poids qui est ici pris comme point de départ avec la valeur 100 0/0 :

Séjour dans le vide	Poids du résidu	Valeur centési- male du résidu	Perte centésimale
2 jours	1 gr. 8810	100 %	
3 jours	1 8402	97,83	2,17 %
4 jours	1 8282	97,19	2,81
5 jours	1 8199	96,75	3,25
6 jours	1 8162	96,56	3,44

Une telle perte continue ne peut évidemment être attribuée à la lenteur de la dessiccation, et montre ce fait très intéressant, que la réaction du glucose et du glycolle, que nous avons vu s'accomplir à 34° , se poursuit même à 15° après qu'elle a été commencée à haute température (1).

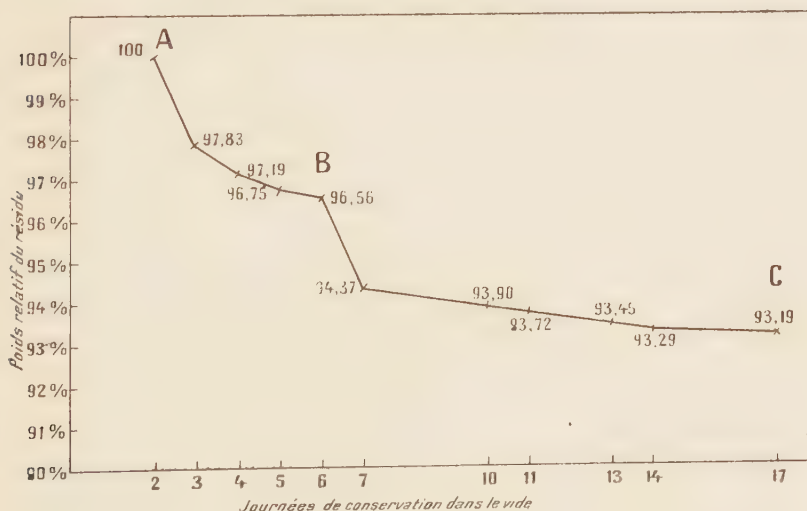
A la fin du 6^e jour, le résidu a été extrait du vase auquel il adhérait un peu ; le produit bien pulvérisé et mélangé pesait 1 gr. 7798, poids

1. Dans un exsiccateur à vide, il est vrai. Le vide tient d'ailleurs mal, sans doute à cause d'une petite production de CO^2 .

qui, bien entendu, représentait encore 96,56 0/0 du poids originel de la partie aliquote correspondante. Des prélèvements successifs ont été faits pour les analyses centésimales, en même temps qu'on déterminait les nouvelles pertes encore subies dans le vide par les parties aliquotes restantes. Une série de calculs très simples a permis de déterminer, à chaque jour de pesée, la fraction centésimale que représentait encore le résidu par rapport à son poids initial, et la perte centésimale par rapport à l'état initial. Voici donc la suite du tableau :

Séjour dans le vide	Valeur centésimale du résidu	Perte centésimale
7 jours.	94,37 0/0	5,63 0/0
10 jours.	93,90	6,10
11 jours.	93,72	6,28
13 jours.	93,45	6,55
14 jours.	93,29	6,71
17 jours.	93,19	6,81

La perte, suivie pendant 17 jours, ne cesse donc pas, et montre que la réaction, vers 15°, se poursuit indéfiniment, même à sec. La marche des pertes est représentée par la courbe ci-dessous : la branche AB traduit les pertes antérieures au broyage du résidu ; la branche BC représente les pertes qui ont suivi ce broyage, dont l'effet immédiat a été d'accélérer pour un temps la déperdition.



Analyse centésimale du résidu.

I. — Résidu après 11 jours de vide. — Substance : 0 gr. 2064. — CO^2 : 0 gr. 3867 — H^2O : 0 gr. 1070. — C = 51,11 0/0. — H = 5,77 0/0.

II. — Résidu après 13 jours de vide. — Substance : 0 gr. 2051. — CO^2 : 0 gr. 3864. — H^2O (perdu). — C = 51,39 0/0. — H (perdu).

III. — Résidu après 17 jours de vide. — Substance : 0 gr. 1838. — CO^2 : 0 gr. 3483 — H^2O : 0 gr. 0978. — C = 51,69 0/0. — H = 5,93 0/0.

IV. — Résidu après 6 jours de vide. Méthode Dumas. — Substance : 0 gr. 2028. — N^2 dégagé : 7 cc. 7 à 19° et 766,6 mm. (20^0) = 8 mgr. 8611. — N = 4,37 0/0 (Combustion difficile).

V. — Résidu après 13 jours de vide. Méthode Kjeihdahl. Substance : 0 gr. 4528. — NH^3 quart-normal recueilli : 5 cc. 75, contenant 0 gr. 020125 de N. — N = 4,44 0/0.

	I	II	III	IV	V
C	51,11	51,39	51,69	—	—
H	5,77	—	5,93	—	—
N	—	—	—	4,37	4,44

Composition élémentaire du résidu. — En considérant les analyses qui précèdent, on constate qu'à mesure que le temps s'écoule, la matière résiduelle s'enrichit relativement en carbone et en azote, ce qui corrobore la perte continuelle d'anhydride carbonique que nous avons admise. Cette circonstance empêche donc tout bilan d'avoir une grande précision, puisque l'établissement d'un bilan exact exigerait la connaissance de la composition du résidu telle qu'elle était au moment même où a cessé le passage du courant d'oxygène et le recueil de l'anhydride carbonique, et que des modifications se sont produites dans les journées suivantes. Il est donc évident qu'une certaine erreur se glissera dans les calculs ; il est permis de penser néanmoins qu'elle ne suffira pas à masquer les phénomènes essentiels.

Nous adopterons pour le calcul les chiffres analytiques dont la détermination a été le moins éloignée du jour de l'expérience, au moins pour le carbone (51,11 0/0) et l'hydrogène (5,77 0/0). Pour l'azote, la méthode Dumas n'a fourni qu'avec peine et lenteur les dernières fines bulles d'azote : on peut craindre que le chiffre soit un peu faible, et nous adopterons celui de la méthode Kjeihdahl (4,44 0/0). Il restera donc pour l'oxygène 38,68 0/0. Cette composition centésimale *approximative* sera attribuée au poids du résidu tel qu'il avait été déterminé

après le 6^e jour, au moment où ont commencé les prises d'essai pour analyses soit 1 gr. 8162.

Pertes élémentaires pendant la réaction. — En effectuant le calcul sur ces bases, on peut comparer les quantités retrouvées de C, H, N, O, à celles que contenait la matière mise en réaction : on peut alors établir le bilan que voici :

	Placé dans le vase	Retrouvé dans le vase	Echappé du vase	Retrouvé dans CO ²	Echappé ailleurs que dans CO ²
C	0,9616	$4,8162 \frac{51,41}{100} = 0,9283$	0,0333	0,0286	0,0047
H	0,1670	$4,8162 \frac{5,77}{100} = 0,1048$	0,0622	0	0,0622
N	0,0932	$4,8162 \frac{4,44}{100} = 0,0806$	0,0126	0	0,0126
O	1,2819	$4,8162 \frac{38,68}{100} = 0,7025$	0,5794	0,0762	0,5032

Laissons de côté la petite perte apparente en azote : 0 gr. 0126 sur 0,0932, soit 13,5 0/0. Je ne puis dire si cette perte est réelle ou non, les analyses du résidu étant un peu sujettes à suspicion, à cause de la grande résistance de cette matière soit à la combustion au contact de l'oxyde de cuivre, soit même à l'attaque sulfurique.

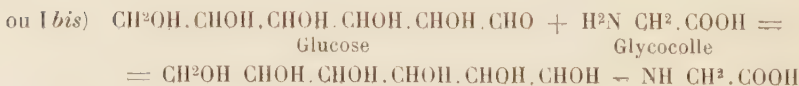
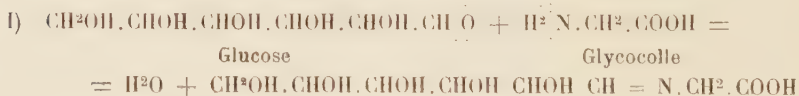
La quantité d'hydrogène disparue, soit 0 gr. 0622, exigerait pour former de l'eau 0 gr. 4976 d'oxygène. Or, d'après le bilan, le système aurait perdu 0 gr. 5032 d'oxygène : resterait donc à justifier l'emploi de 0 gr. 5032 — 0 gr. 4976 = 0 gr. 0056 d'oxygène. On remarquera d'autre part que le mélange en réaction avait perdu, lors des analyses, en outre des 0 gr. 0286 de carbone retrouvé dans les absorbeurs à CO², encore 0 gr. 0047 de carbone, sous forme, soit peut-être d'un peu de corps organiques volatils retenus par les absorbeurs sulfuriques de l'expérience, soit de CO² libéré dans l'exsiccateur pendant les 6 premiers jours de conservation. Dans cette dernière hypothèse, à cette perte de carbone répondrait une perte maxima de 0 gr. 0125 d'oxygène : l'écart entre les déterminations expérimentales et la théorie serait ici de 0,0125 — 0,0056 = 0 gr. 0069 d'oxygène. En résumé l'imprécision sur l'oxygène serait comprise entre 5 et 7 milligrammes, soit 1 0/0 seulement de la quantité échappée du vase, ce qui est entièrement négligeable, étant données les difficultés expérimentales et l'accumulation de toutes les erreurs sur le chiffre de l'oxygène.

On peut donc affirmer, malgré les imprécisions dues à la prolongation de la réaction, que *la perte subie par le système, outre l'anhydride carbonique, consiste en oxygène et hydrogène dans les proportions nécessaires à former de l'eau.*

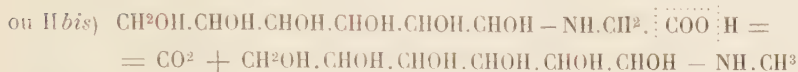
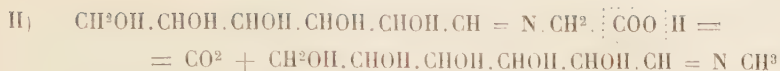
Pour connaître les proportions relatives de CO^2 et de H^2O perdues, considérons que le mélange de glycocolle (0 gr. 4993) et de glucose (2 gr. 0044), qui pesait avant réaction 2 gr. 5037, ne pesait plus après réaction et 2 jours de dessiccation, que 1 gr. 8810, et avait perdu au total 0 gr. 6227. On avait recueilli dans les absorbeurs 0 gr. 1048 de CO^2 ; la différence est 0 gr. 6227 — 0 gr. 1048 = 0 gr. 5179. Or si l'on compare le nombre de molécules représentées par 0 gr. 1048 de CO^2 et 0 gr. 5179 de H^2O , on trouve que ces molécules sont entre elles comme dans l'expression ($\text{CO}^2 + 12,38 \text{ H}^2\text{O}$). Comme il a disparu en réalité un peu plus que 0 gr. 1048 de CO^2 et un peu moins que 0 gr. 5179 de H^2O (à cause du séjour dans l'exsiccateur), on trouve très exactement que *la perte de 1 molécule CO^2 s'accompagne de la perte de 12 molécules H^2O .*

Origine de l'anhydride carbonique dégagé. — Les résultats de cette expérience me semblent démontrer que CO^2 dégagé ne peut provenir que du carboxyle du glycocolle : car, si une partie de l'oxygène du glucose s'échappe, il entraîne avec lui la quantité d'hydrogène nécessaire à former de l'eau, et ne saurait donc prendre part à la constitution d'une substance autre que cette eau.

Interprétation constitutionnelle de la réaction. — D'après les données qui précèdent, il semble qu'on puisse interpréter de la manière suivante la réaction du glycocolle en présence d'un excès de glucose. Il y aurait d'abord réaction de la fonction aldéhydique du glucose sur la fonction aminée du glycocolle, avec ou sans élimination d'eau :



Puis les nouvelles conditions d'équilibre ainsi créées dans la molécule détermineraient la rupture du carboxyle, le départ de CO^2 , et la formation d'un résidu méthylé à l'azote :



Enfin s'accomplirait une déshydratation enlevant des oxhydriles et des atomes d'hydrogène du glucose, élimination qui a forcément pour effet de créer des doubles liaisons entre certains atomes de carbone, et probablement des cycles moléculaires ainsi qu'il est fréquent en pareil cas.

Nous avons vu qu'à l'élimination de 1 molécule CO^2 correspond l'élimination de 12 molécules H^2O , qui ne peuvent être fournies, bien entendu, que par *plusieurs* molécules de glucose. A la rupture d'une seule molécule de glycocolle correspond donc la déshydratation de plusieurs molécules de glucose. Doit-on supposer que ces molécules de glucose déshydratées restent indépendantes les unes des autres, ou qu'elles s'associent en une seule molécule complexe?

On concevrait que les molécules de glucose voisines de celle où se fixe l'azote du glycocolle puissent se déshydrater pour leur propre compte, en même temps que celle-ci mais *à côté* d'elle et sans s'y unir forcément. On sait en effet que les sucres chauffés avec les acides minéraux se déshydratent pour former des *matières humiques* analogues d'apparence, comme nous le verrons, aux produits de notre réaction. Cependant on objecterait aussitôt qu'une telle propriété des acides chlorhydrique ou sulfurique ne devrait se retrouver, chez un acide aussi faible que le glycocolle, qu'à un degré fort atténué et tout à fait hors de proportion avec l'intensité de notre réaction; de plus, celle-ci ne s'opère qu'au prix de la rupture du carboxyle, c'est-à-dire de la propre disparition de cet acide déjà si faible.

Aussi serait-il plus plausible de concevoir, en évitant d'ailleurs toute affirmation prématurée, que plusieurs molécules de glucose pourraient se souder à celle qui reçoit d'abord l'azote, et qu'ainsi se formeraient des molécules complexes non saturées, renfermant, pour un assez grand nombre d'atomes de carbone, un atome d'azote lui-même porteur d'un groupe alkyle, méthylé dans le cas particulier du glycocolle.

Nous verrons plus loin que cette conception s'étend aux divers acides aminés et aux divers sucres, et qu'ainsi prennent naissance les matières antérieurement décrites sous les noms de *mélanoïdines*, *acides mélanoïdiques*, *substances humiques azolées*, etc...

Caractères des substances brunes formées. — I. Substances solubles dans l'eau. — Les matières brunes qui prennent naissance au cours de l'action du glucose en excès sur le glyocolle, ne constituent pas une espèce chimique unique, mais bien plusieurs espèces qui diffèrent par leurs propriétés. Elles ne se forment pas toutes en même temps, mais semblent prendre naissance les unes après les autres, comme si elles correspondaient aux stades successifs d'une même série de phénomènes.

Dans les premiers temps de la réaction, alors qu'on voit le mélange prendre peu à peu sa coloration, et pendant tout le temps qu'on observe le dégagement de gaz carbonique, il se produit seulement une *matière brune soluble dans l'eau* (1). On peut en effet pousser jusqu'à refus l'évaporation de la masse poisseuse, à froid ou sur le bain-marie, et la masse brune conserve la propriété de se redissoudre facilement et intégralement dans l'eau froide.

La solution aqueuse qui contient la matière brune soluble (avec un excès de glucose et peut-être de glyocolle) possède une réaction très légèrement acide au papier de tournesol. Elle est très facilement décolorée par le noir animal, qui fixe rapidement la matière brune, surtout à chaud.

La matière brune n'est précipitée, de la solution aqueuse du mélange, ni par les acides (chlorhydrique, sulfurique, acétique), ni par les alcalis (soude, potasse, ammoniaque), ni par les sels alcalins (chlorure de sodium, sulfate de potassium) ou alcalino-terreux (chlorure de baryum, sulfate de magnésium).

En revanche, si à la solution brune on ajoute un excès d'eau de *baryte*, on voit se produire, à froid déjà, de légers flocons brun clair qui augmentent et s'agglomèrent si on porte le liquide à l'ébullition. La matière brune se fixe facilement surtout si on ajoute à la solution un excès d'hydrate de baryte en poudre, et qu'on maintienne quelque temps à l'ébullition ou au bain-marie : il se produit alors un magma de couleur ocracée, tandis que le liquide brun se décolore en partie (mais non complètement : il reprend d'ailleurs peu à peu une coloration foncée, à cause des réactions qui se poursuivent aux dépens des substances organiques qu'il contient encore, soit entre elles, soit avec intervention de la baryte). Le précipité barytique est décanté, essoré à la trompe, de nouveau délayé avec soin dans l'eau, essoré, délayé,

1. Il est bien entendu qu'en employant l'expression « matière brune soluble dans l'eau » je ne prétends nullement affirmer qu'il s'agisse d'une *espèce chimique unique*, et je tiens à laisser en suspens cette question.

essoré, etc. Les derniers lavages sont *presque* incolores, mais conservent cependant une très légère teinte jaunâtre, comme si à chaque fois l'eau dissolvait des traces du précipité. Le dernier lavage, bien filtré, évaporé à sec dans une petite capsule, laisse un faible résidu jaune-brun qui contient des traces d'azote, ainsi qu'on le constate à la calcination ; pendant cette calcination, le résidu charbonne un peu, puis laisse de la baryte d'un blanc pur. Il est certain que les lavages ne contiennent plus qu'une quantité insignifiante de matière organique, dont la présence d'ailleurs résulte peut-être de la solubilité naturelle des substances contenues dans le précipité barytique ; et ce précipité barytique peut être considéré comme suffisamment débarrassé de son eau-mère.

Or le précipité barytique a conservé sa teinte ocracée ; il dégage à la calcination une odeur pyridique suffisamment intense pour déceler la présence d'une quantité non négligeable d'azote. Il est donc bien certain qu'une partie importante de la matière brune soluble dans l'eau s'est fixée sur la baryte.

Par une technique exactement semblable, et qu'il est inutile de redire, j'ai constaté que cette matière brune soluble dans l'eau se fixe, sinon en totalité, du moins pour la très majeure partie, sur la *chaux* ou sur la *magnésie* (employées en excès sous forme pulvérulente).

On obtient une fixation du même genre, quoique moins abondante, lorsqu'on maintient la solution aqueuse brune en ébullition, ou en digestion au bain-marie, avec un excès de *carbonate de baryum*, de *carbonate de calcium*, de *carbonate de magnésium*.

En revanche, ni les chlorures de baryum, calcium, magnésium, ni les acétates de ces mêmes métaux ne précipitent la matière brune contenue dans le liquide aqueux. Pour fixer la matière brune, il est donc nécessaire d'opérer dans un milieu alcalin ou restant neutre grâce à la présence d'un excès de carbonate ; dans le cas où la décomposition du sel alcalino-terreux tendrait à déplacer un acide autre que l'acide carbonique, la matière brune n'est pas précipitée.

Il ne faudrait pas cependant se hâter de croire que la fixation de la matière brune soluble dans l'eau par la baryte, la chaux, la magnésie, ou leurs carbonates, résulte d'une saturation chimique. Cette fixation doit résulter également, peut-être même exclusivement, de phénomènes physiques d'adsorption.

Ainsi, rien n'est plus simple que de fixer la matière brune sur un précipité de *sulfate de baryum* produit par des doubles décompositions de sels neutres. Dans le liquide aqueux brun on dissout une certaine quantité de sulfate de sodium ou de potassium, et on porte la solution

brune au voisinage de l'ébullition, puis on y introduit un excès de chlorure de baryum en solution chaude : le précipité de BaSO_4 tombe aussitôt au fond du vase, teint d'une couleur ocracée, tandis que la coloration brune du liquide surnageant a perdu notablement de son intensité. Le précipité barytique se lave bien, surtout si l'on emploie de l'eau contenant un peu de BaCl_2 ; malgré les lavages répétés, le précipité de sulfate de baryum conserve sa teinte ocracée, et dégage des vapeurs azotées à la calcination, tout en noircissant. Le sulfate de baryum a donc adsorbé une quantité notable de matière brune.

Toutefois, ici encore, le caractère neutre de la solution favorise la fixation de la matière brune sur le précipité barytique, tandis que le caractère acide l'empêche. Ainsi, si dans l'expérience précédente on ajoute à la solution aqueuse brune, non plus un sulfate alcalin, mais un peu d'acide sulfurique, puis du chlorure de baryum, le précipité de BaSO_4 qui se forme est presque blanc, tandis que la matière brune reste dans la solution, en présence de l'acide chlorhydrique formé par double décomposition.

D'une manière tout analogue, j'ai constaté la fixation *très aisée et abondante* de la matière brune soluble dans l'eau, sur les précipités de *phosphate de calcium*. J'emploie à dessein l'expression vague « phosphate de calcium », n'ayant pas jugé nécessaire, pour le moment, de préciser la composition exacte des précipités auxquels j'ai eu affaire, et qui consistaient probablement en des mélanges variables de phosphates tricalcique et bicalcique. En dissolvant, dans le liquide brun originel, une certaine quantité de phosphate disodique cristallisé, puis ajoutant un excès de chlorure de calcium, le précipité gélatineux qui se forme aussitôt est d'emblée fortement coloré en brun, sans qu'il soit nécessaire de le maintenir en digestion à chaud. Toutefois la digestion de 2-3 heures sur le bain-marie bouillant a pour avantage d'agglomérer le précipité de phosphate de calcium, qui peut alors se filtrer et se laver assez facilement : après lavages réitérés, il reste riche en azote, et d'une couleur brun foncé analogue à celle de la terre végétale, du moins tant qu'il reste humide. Lors de la dessiccation, sa teinte pâlit assez notablement, comme celle de tous les précipités mentionnés plus haut.

Enfin le phosphate dit tricalcique du commerce, à l'état pulvérulent, mis en digestion pendant quelques heures, sur le bain-marie bouillant, avec le liquide brun originel, se teinte lui aussi d'une couleur brune, en fixant la matière azotée, comme le font les carbonates de Ba, Ca, Mg, mais plus facilement et plus abondamment encore que ceux-ci.

Caractères des substances brunes formées. — II. Formation de substances insolubles dans l'eau. — On vient de voir que, dans les premières phases de la réaction du glyocolle et du glucose, la ou les substances brunes formées restaient solubles dans l'eau, intégralement et facilement. Cette phase de la réaction paraît correspondre à celle du dégagement de CO^2 .

Mais plus tard on voit apparaître en abondance des *matières brunes insolubles dans l'eau*. Elles peuvent prendre naissance même à basse température (34°), mais leur formation va naturellement plus vite si l'on opère vers 100° . Elles apparaissent, non seulement dans les mélanges très concentrés, mais aussi en présence d'un excès d'eau. Un moyen très facile de les obtenir en abondance consiste à placer dans un cristalliseur assez vaste (300 cc. par exemple) une certaine quantité de glyocolle pur (20 gr.) avec 4 fois son poids de glucose (80 gr.), dissoudre le tout dans le minimum d'eau chaude, et abandonner sur le bain-marie. La réaction débute par la formation des matières brunes solubles et le dégagement d'anhydride carbonique : c'est en vue de la mousse qui se produit alors qu'il est bon d'opérer dans un vase assez spacieux. On laisse le mélange atteindre une concentration assez élevée : si on pousse la concentration jusqu'à siccité, on obtient une masse sèche d'un noir brun, formée de lamelles brillantes, et richement vacuolisée par les bulles de CO^2 . Si au contraire on reprend par un assez grand volume d'eau le sirop d'abord obtenu, tout se redissout, et dans la solution chaude maintenue sur le bain-marie on voit apparaître peu à peu des flocons et des membranes de matière brune insoluble. Si on laisse encore se produire une forte concentration, le paquet de membranes insolubles devient très volumineux.

On ajoute de nouveau un assez grand volume d'eau, dans lequel on divise et remet en suspension, le mieux possible, la masse membraneuse, et on abandonne encore à l'évaporation sur le bain-marie. L'addition d'eau et la concentration sont renouvelées un certain nombre de fois : à chaque concentration la masse insoluble augmente. Dans l'exemple cité (20 gr. de glyocolle et 80 gr. de glucose) ces alternatives ont été répétées pendant une dizaine de jours, puis la masse brune a été broyée au mortier pour diviser autant que possible les membranes dont elle était formée. Le tout a été épuisé un grand nombre de fois par l'eau bouillante, avec répétition du broyage, jusqu'à ce que l'eau de lavage, d'abord très colorée en brun, fût à peu près incolore ; la masse insoluble résiduelle (fraction A) de couleur brun chocolat, séchée à 110° , pesait 49 gr. 90 (rendement pratique).

Les liquides de lavage, réunis et remis en concentration, ont à nou-

veau donné naissance à de la matière brune insoluble, de consistance membraneuse, qui après une semaine a été épuisée à l'eau bouillante comme la fraction précédente, et constituait une nouvelle fraction brune insoluble (fraction B) pesant 4 gr. 70 après dessiccation à 110° (rendement pratique).

Les liquides de lavage de la fraction B, concentrés et maintenus au bain-marie pendant une semaine encore, ont formé une troisième fraction brune insoluble (fraction C), du poids approximatif de 1 gr. 25 après dessiccation à 110° (rendement pratique).

Enfin les liquides provenant du lavage de la fraction C n'ont plus semblé fournir, par leur concentration, de matière insoluble, mais seulement une pâte brune (fraction D) du poids approximatif de 9 gr. 80 après séjour à 110°, séjour qui l'avait desséchée en une masse vitreuse.

Tous les rendements indiqués ici sont, comme je l'ai dit, des rendements pratiques, qui ne tiennent pas compte des petites pertes inévitables au cours des manipulations. L'expérience ne saurait donc être considérée comme quantitative; il m'a semblé toutefois qu'on obtiendrait, relativement aux destinées de l'azote introduit sous forme de glycocolle, un renseignement intéressant bien qu'approximatif, en dosant l'azote contenu dans les 4 fractions A, B, C, D.

Dosage de l'azote dans les fractions successives.

I. — Fraction insoluble A. Méthode Kjehldahl. — Substance : 1 gr. 0022. — NH^3 quart-normal recueilli : 12 cc. 45, contenant 0 gr. 043575 de N. — $\text{N} = 4,35 \text{ 0/0}$.

II. — Fraction insoluble B. Méthode Kjehldahl. — Substance : 1 gr. 0000. — NH^3 quart-normal recueilli : 15 cc. 65, contenant 0 gr. 054775 de N. — $\text{N} = 5,48 \text{ 0/0}$.

III. — Fraction insoluble C. Méthode Kjehldahl. — Substance : 0 gr. 6040. — NH^3 quart-normal recueilli : 10 cc. 3, contenant 0 gr. 03605 de N. — $\text{N} = 6,00 \text{ 0/0}$.

IV. — Fraction soluble D. Méthode Kjehldahl. — Substance : 0 gr. 9923. — NH^3 quart-normal recueilli : 17 cc. 3, contenant 0 gr. 06055 de N. — $\text{N} = 6,10 \text{ 0/0}$.

Répartition de l'azote dans les fractions successives. — On voit que la teneur en azote des fractions successives, loin de diminuer, augmente constamment, et en particulier que, après la formation de tout ce que le mélange peut fournir de matière insoluble (fractions A, B, C), il reste encore de l'azote dans l'excédent (fraction D). Il semble donc bien que si la portion principale, la fraction A, ne contient que 4,35 0/0

d'azote, ce n'est pas faute d'azote disponible, mais parce que la constitution même des produits qui peuvent prendre naissance dans ces conditions, ne comporte pas une teneur plus élevée.

D'autre part, si l'on cherche à se rendre compte de ce qu'est devenu l'azote introduit sous forme de glycocolle (3 gr. 733), on obtient le tableau suivant :

Fraction	Poids	Teneur en N	N contenu
Insoluble A . . .	49 gr. 90	4,35 %	2 gr. 17
Insoluble B . . .	4 70	5,48	0 26
Insoluble C . . .	1 25	6,00	0 075
Soluble D . . .	9 80	6,10	0 60
Pertes . . .			0 63

Il a donc été perdu 0 gr. 63 d'azote, soit près de 17 0/0 de la quantité mise en œuvre. Il a été dit déjà que les opérations n'avaient pas été poursuivies avec des précautions quantitatives. Néanmoins un chiffre de 17 0/0 est peut-être bien élevé pour une perte de manipulation proprement dite : l'élévation de ce chiffre, jointe à la disparition d'azote constatée lors du bilan que j'ai cherché à établir plus haut, me conduit à me demander si peut-être il n'y aurait pas une perte véritable sous forme d'azote libre ou en combinaison volatile (méthylamine ?)

Caractères des substances brunes formées. — III. Composition centésimale de la fraction insoluble principale. — On vient de voir déjà une analyse de la fraction insoluble A, qui a donné pour l'azote, par la méthode Kjehldahl, le chiffre 4,35 0/0. L'analyse complète de cette fraction a été effectuée :

I. — Substance : 0 gr. 2111. — CO_2 : 0 gr. 4534. — H_2O : 0 gr. 0884. — C = 58,60 0/0. — H = 4,64 0/0.

II. — Substance : 0 gr. 2109. — CO_2 : 0 gr. 4569. — H_2O : 0 gr. 0952. — C = 59,08 0/0. — H = 5,03 0/0.

III. — Substance : 0 gr. 2067. — CO_2 : 0 gr. 4462. — H_2O : 0 gr. 0944. — C = 58,88 0/0. — H = 5,08 0/0.

IV. — Substance : 1 gr. 0022. — Méthode Kjehldahl. NH_3 quart-normal recueilli : 12 cc. 45, contenant 0 gr. 043575 de N. — N = 4,35 0/0.

V. — Substance : 0 gr. 2681. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 10 cc. 85 à 19° et 750,3 mm. (16°) = 12 mgr. 2225. — N = 4,56 0/0.

VI. — Substance : 0 gr. 2515. — Méthode Dumas. Azote dégagé : 9 cc. 4 à 19° et 762,8 mm (16°) = 10 mgr. 4259. — N = 4,15 0/0.

Ces analyses sont groupées dans le tableau suivant :

	ANALYSE						MOYENNE
	I	II	III	IV	V	VI	
C	58,60	59,08	58,88	—	—	—	58,85
H	4,64	5,03	5,08	—	—	—	4,92
N	—	—	—	4,35	4,56	4,15	4,35
O	—	—	—	—	—	—	31,88

La moyenne des analyses donnerait pour la matière brune insoluble (fraction A) la composition suivante :

Carbone	58,85
Hydrogène	4,92
Azote	4,35
Oxygène	31,88
	100,00

Rien ne nous autorise à *affirmer* qu'il s'agisse ici d'une substance unique et définie. Si on calcule néanmoins quelle serait la formule d'une substance définie de même composition centésimale, on arrive très sensiblement à la formule $C^{16}H^{15}NO^6$, laquelle comporterait les teneurs que voici :

Calculé pour $C^{16}H^{15}NO^6$		Trouvé
$C^{16} = 192$	60,57	58,85
$H^{15} = 45$	4,73	4,92
$N = 14$	4,42	4,35
$O^6 = 96$	30,28	31,88
	317	100,00
	100,00	100,00

La concordance des chiffres analytiques avec cette formule $C^{16}H^{15}NO^6$ n'est d'ailleurs qu'approximative, surtout en ce qui concerne le carbone; il convient de remarquer que la combustion de la substance n'est pas aisée, et cette particularité pourrait expliquer un petit déficit.

Le bilan général de la réaction du glycolle sur le glucose, dans ses premiers stades, nous avait appris déjà que, pour 1 atome d'azote,

devaient entrer en réaction plus de 2, c'est-à-dire au moins 3 molécules de glucose. Si à la totalité du carbone C^{18} de ces 3 molécules $C^6H^{12}O^6$, on ajoute l'atome de carbone restant du glycocolle lors de la rupture du carboxyle, on arrive à un total C^{19} , répondant par exemple à une formule telle que $C^{19}H^{17}NO^6$ ou $C^{19}H^{19}NO^7$, dont voici les teneurs centésimales :

Calculé pour $C^{19}H^{17}NO^6$		Calculé pour $C^{19}H^{19}NO^7$	
$C^{19} = 228$	64,23	$C^{19} = 228$	64,13
$H^{17} = 47$	4,79	$H^{19} = 49$	5,09
$N = 14$	3,94	$N = 14$	3,75
$O^6 = 96$	27,04	$O^7 = 112$	30,03
355	100,00	373	100,00

On constate que la formule $C^{19}H^{17}NO^6$ ne répond pas à notre matière, car elle comporte un chiffre de carbone (64,23 0/0) trop élevé ; et la formule $C^{19}H^{19}NO^7$ n'est pas davantage admissible, car elle comporte un chiffre d'azote (3,75 0/0) manifestement trop faible. *Si donc la matière brune devrait être considérée comme une substance à peu près pure*, on ne pourrait guère lui attribuer une formule en C^{19} , et le nombre des atomes de carbone ne semblerait pas supérieur à 16.

Néanmoins la donnée fondamentale à laquelle m'avait conduit déjà le bilan des éléments en réaction subsisterait intacte, à savoir la mise en jeu de 3 molécules de glucose pour la constitution de la nouvelle molécule azotée. La disparition d'une petite proportion du carbone s'expliquerait sans doute par une réaction d'importance quantitative accessoire, et que rendraient assez vraisemblable certains faits connus, comme la production d'acide formique et d'acide lévulique dans la transformation des sucres en matières humiques sous l'influence des acides (B. TOLLENS ; M. CONRAD et M. GUTHZEIT (1). Il est tout à fait caractéristique de remarquer que dans leurs recherches sur les matières « humiques » non azotées dérivées des sucres sous l'action des acides, M. BERTHELOT et G. ANDRÉ (2) ont précisément trouvé pour leur acide humique une formule en C^{18} , traduisant la condensation de trois molécules d'hexose.

1. M. CONRAD et M. GUTHZEIT, Ueber die Entstehung und Zusammensetzung der Huminsubstanzen (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 19, 2844, 1886).

2. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ, Recherches sur les substances humiques (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 6^e s., 25, 364, 1892).

Caractères des substances brunes formées. — IV. Action des réactifs sur les matières insolubles dans l'eau. — Les produits bruns dont il vient d'être question sont insolubles dans l'eau, froide ou chaude, insolubles aussi dans les *acides* étendus, à froid du moins et même à chaud si le contact n'est pas trop prolongé.

L'*ammoniaque*, même assez étendue, en extrait une certaine quantité de matière brune, qui reprécipite partiellement lorsqu'on neutralise la solution par l'acide chlorhydrique ou mieux par l'acide acétique.

La *potasse* et la *soude* dissolvent instantanément une partie de la masse, sous la forme d'un liquide brun, fortement coloré, dont la neutralisation par les acides reprécipite des flocons bruns. Mais une partie très importante des matières brunes insolubles résiste très énergiquement à l'action des alcalis, même à chaud : la dissolution de cette partie n'est que très lente, et je me garderai d'affirmer qu'elle puisse être totale. Je n'ai pu jusqu'ici me livrer sur cette question, à des études approfondies, qui m'auraient entraîné trop loin du sujet primitif de mes recherches.

En revanche je me suis livré, à plusieurs reprises, à des tentatives pour savoir si quelque reste de glyocolle aurait pu se fixer dans la molécule des substances brunes, sous la forme d'un groupe glycole réhydratable, susceptible de régénérer ainsi le glyocolle, au cours d'une décomposition hydrolytique. Dans ce but, les matières brunes, bien lavées à l'eau bouillante (l'absence complète du glyocolle dans ces lavages était toujours contrôlée), étaient mises en suspension dans 50 fois environ leur poids d'*acide sulfurique dilué au 1/10^e*, et le tout était maintenu en ébullition pendant 10 heures, avec reflux de l'eau vaporisée. La matière en suspension paraissait diminuer un peu de volume, mais il en restait une grande quantité : elle était séparée, par filtration, du liquide sulfurique.

Le liquide sulfurique filtré, de teinte jaune-brun assez peu accentuée, était placé dans une vaste capsule, chauffé au bain-marie, puis additionné d'eau de baryte chaude par portions successives, jusqu'à saturation *presque* complète de H^2SO^4 . On avait soin d'éviter tout excès de baryte, qui aurait pu exercer une action secondaire décomposante. Débarrassé du précipité de $BaSO^4$ par filtration, le liquide était encore bouilli avec du carbonate de baryum qu'il suffisait d'employer en très petite quantité, puis filtré bouillant. Enfin le dernier filtrat, concentré assez fortement, était bouilli avec de l'oxyde cuivrique précipité, de façon à transformer en combinaison cuivrique le glyocolle éventuel.

Quatre essais du même genre ont été tentés : jamais je n'ai obtenu la moindre coloration bleue décelant la présence du glyocolle ; je

crois donc pouvoir conclure que dans la constitution des matières brunes ne figure aucun groupement de glyocolle régénérable par l'hydrolyse.

Il reste enfin à dire quelques mots du produit qui résiste à l'action de l'acide sulfurique à 10 0/0, après 10 heures d'ébullition. Bien débarrassé, par une série de lavages, du liquide sulfurique qui le baigne, ce produit se présente sous la forme de *paillettes brillantes, d'un noir de jais*, bien différentes comme aspect de la matière brune dont elles sont le résidu. Ce produit résiste énergiquement aux alcalis caustiques qui ne semblent pas le dissoudre, même à chaud. Pour arriver à le dissoudre, il faut le laisser séjourner dans l'acide sulfurique concentré, où il forme peu à peu une liqueur noire. La dissolution par H^2SO^4 concentré peut avoir lieu rapidement si l'on chauffe, mais on voit aussitôt se produire un autre phénomène, un dégagement très abondant d'anhydride sulfureux, témoin d'une oxydation énergique de la substance par l'acide sulfurique chaud. La solution noire dans H^2SO^4 concentré, versée dans un excès d'eau, laisse précipiter la matière en fins flocons noirs, comme le ferait une solution sulfurique d'indigotine. Même sous cette forme très divisée de fins flocons, la substance noire résiste aux alcalis, qui ne la dissolvent qu'en partie; la solution brune précipite à nouveau par les acides.

La substance noire qui résiste à l'attaque prolongée par H^2SO^4 dilué bouillant, renferme de l'azote en proportion notable, car à la calcination elle dégage en abondance des vapeurs pyridiques. Le dosage de l'azote a été tenté par la méthode Dumas : malheureusement la substance, même finement divisée et répartie dans une longue colonne d'oxyde de cuivre, brûle mal et ne dégage que lentement son azote. Après 4 heures de chauffage, et au moment où l'opération a dû être interrompue faute d'une provision de bicarbonate suffisante pour continuer le balayage par le gaz carbonique, on voyait encore se dégager dans la potasse des bulles gazeuses non absorbables en totalité. Le chiffre d'azote trouvé n'est donc qu'un minimum inférieur à la réalité :

Méthode Dumas. — Substance : 0 gr. 1672. — N^2 dégagé : 5 cc. 05 à 20° et 768,4 mm. (19°) = 5 mgr. 79755. — $\text{N} = 3,47$ 0/0 (chiffre certainement trop faible).

La substance a été soumise alors à l'attaque par la méthode Kjehldahl, en présence des sels déshydratés; l'attaque n'est pas rapide, mais cependant satisfaisante :

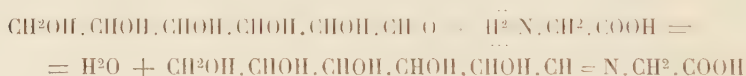
Méthode Kjehldahl. — Substance : 1 gr. 0052. — NH^3 quart-normal recueilli : 13 cc. 95, contenant 0 gr. 048825 de N. — $\text{N} = 4,86$ 0/0.

La substance noire qui reste comme résidu inattaquable après 10 heures d'ébullition dans l'acide sulfurique à 10 0/0, possède donc une teneur en azote voisine de 4,86 0/0.

II. — ACTION DU D.GLUPOSE SUR LE GLYCOCOLLE EN EXCÈS

Réaction du d.glucose sur un excès de glyocolle.— On vient de voir que, dans le cas où le glucose se trouve dans le mélange en excès par rapport au glyocolle, la fonction aminée de ce dernier corps réagit tout entière sur la fonction aldéhydique du glucose : il ne reste donc aucune fraction du glyocolle susceptible de réagir avec les oxhydriles alcooliques du sucre, d'être éthérisée par ces fonctions alcooliques, et de donner naissance, par rupture consécutive de l'éther, à des enchaînements peptidiques. De fait, dans les produits d'action du glucose en excès sur le glyocolle, il a été impossible de déceler aucune substance capable de régénérer du glyocolle par hydrolyse : ces produits ne renfermaient aucune substance de nature peptidique.

Lorsqu'on fera réagir, au contraire, plusieurs molécules de glyocolle sur une seule molécule de glucose, il est à prévoir que la première molécule de glyocolle réagira aussitôt, comme dans le cas précédent, sur la fonction aldéhydique :



Le produit de condensation serait, bien entendu, capable de subir comme précédemment la série de phénomènes aboutissant à la formation des mélanoidines.

Mais d'autre part, une fois la fonction aldéhydique ainsi bloquée par une molécule de glyocolle, on peut se demander si le départ des oxhydriles est obligatoire et instantané, ou s'ils peuvent subsister encore, au moins temporairement, dans la molécule. Dans ce dernier cas, rien n'empêcherait de supposer que ces oxhydriles du sucre soient capables de réagir en tant que fonctions alcooliques sur de nouvelles molécules d'acide aminé, et de conduire ainsi à des synthèses de corps peptidiques par la voie de l'éthérification transitoire. Pour étudier la question, il faudra donc employer, en présence d'une molécule de glucose, *plusieurs* molécules d'acide aminé, la première étant sacrifiée pour le blocage de la fonction aldéhyde, et les autres seules étant sus-

ceptibles de subir une condensation peptidique en supposant qu'il reste des fonctions alcooliques éthérifiables.

J'ai fait réagir sur 1 molécule de glucose (180), 4 molécules de glycolle ($4 \times 75 = 300$).

Dans un petit vase cylindrique, on introduit 1 gr. 80 de glucose pur et 3 gr. de glycolle pur pulvérisés ; on ajoute 10 cc. d'eau, de manière à obtenir une dissolution rapide sur le bain-marie, et on porte ensuite dans l'étuve, dont on élève progressivement la température jusqu'à 170°, point fixe où on maintient alors le mélange, comme dans le travail en présence de glycérine. L'eau s'évapore, le mélange se colore progressivement en brun-foncé, mousse légèrement par dégagement d'un peu d'anhydrique carbonique, mais beaucoup moins que dans le cas où le glucose est en excès, puis finalement se dessèche.

Le résidu, formé essentiellement d'une masse de croûtes de coloration brun-noir, est broyé à plusieurs reprises avec de l'eau bouillante, broyages suivis de décantations et de filtrations. On procède successivement à l'étude de la solution aqueuse S et du résidu insoluble I.

Etude des produits solubles dans l'eau. — La solution aqueuse S, de couleur brune, formée de l'ensemble des lavages, est concentrée au bain-marie, opération pendant laquelle il se forme encore un peu de membranes insolubles. Avant d'arriver à siccité, on ajoute un petit excès d'oxyde cuivrique précipité et lavé, on fait bouillir un instant, et on maintient en digestion sur le bain-marie pendant 2 heures. On filtre : le filtrat est de coloration brun-verdâtre. Le résidu insoluble est épuisé à plusieurs reprises par ébullition avec un peu d'eau, et les lavages aqueux, de couleur d'abord verte, passent de plus en plus, d'un lavage à l'autre, au bleu céleste. Finalement les lavages et le filtrat, réunis, sont mis en concentration au bain-marie, opération pendant laquelle ils déposent un peu d'oxyde de cuivre, qu'on enlève par filtration.

La concentration de la solution aqueuse a fourni une substance cristallisée en bouquets de fines aiguilles de coloration bleu clair, assez peu soluble dans l'eau froide, facilement soluble dans l'eau chaude avec coloration bleu céleste. De cette solution la soude précipite des flocons bleu pâle (hydrate cuivrique) sans donner lieu au moindre virage vers le rose pouvant caractériser un corps biurétique. Plusieurs fractions successives de cette même substance bleue ont été obtenues par concentration méthodique de la solution. Toutes ces fractions réunies, redissoutes dans l'eau chaude, et saturées d'hydrogène sulfuré, ont fourni une solution colloïdale de sulfure de cuivre, lequel ne flocculait

pas spontanément, mais s'est fixé aisément sur une petite quantité de noir animal, par digestion au bain-marie. Après filtration, le liquide parfaitement incolore, évaporé à siccité, a laissé un résidu de gros cristaux durs, présentant la saveur sucrée très nette du glyocolle. Bien que souillés d'une petite quantité d'impuretés jaunâtres, ces cristaux ont été soumis à un dosage d'azote :

Méthode Dumas. — Substance : 0 gr. 2001. — N² dégagé : 31 cc. 2 à 19° et 749,2 mm (19°) = 35 mgr. 0791. — N = 17,53 0/0.

La teneur théorique du glyocolle en azote étant 18,67 0/0, on voit que le chiffre 17,53 0/0 trouvé sur la substance récupérée est très satisfaisant, si l'on remarque que cette substance récupérée n'a subi aucune purification. Il prouve en tout cas que la substance ne saurait être en aucune façon un produit de condensation du glyocolle, mais bien *le glyocolle lui-même, dont on retrouve l'excès inaltéré.*

Les dernières eaux-mères d'où s'étaient déposés les cristaux bleus du glyocollate de cuivre, étaient fortement colorées en brun. Elles n'ont pas fourni d'autre substance cristallisable. En supposant qu'elles en aient contenu une, cette substance n'aurait pu être qu'en quantité très petite, car les eaux-mères étaient elles-mêmes réduites à quelques gouttes. Si donc il s'est formé, dans la réaction du glucose sur le glyocolle en excès, de la cyclo-glycyl-glycine, ce ne peut être qu'en proportion insignifiante. D'autre part il ne s'est certainement pas produit de triglycyl-glycine ni d'autre corps biurétique.

Etude du résidu insoluble dans l'eau. — Le résidu insoluble I est encore à plusieurs reprises broyé soigneusement et digéré dans l'eau bouillante, pour éliminer toute trace éventuelle de glyocolle. Pour contrôle, le dernier lavage, filtré, est concentré au bain-marie en présence d'un peu d'oxyde de cuivre précipité : il n'en dissout pas trace, ce qui démontre l'absence complète de glyocolle libre dans le résidu I bien lavé.

Le résidu insoluble est alors mis en suspension dans l'acide sulfurique à 10 0/0, et maintenu en ébullition pendant 10 heures. Il se dissout en partie, mais une fraction importante reste indissoute, et se présente, après lavages et dessiccation, sous forme de *paillettes noir de jais*, tout à fait identiques d'aspect à celles que laisse l'attaque, dans les mêmes conditions, des mélanoidines obtenues dans l'action du glucose en excès sur le glyocolle.

Le liquide sulfurique, chauffé au bain-marie, est additionné d'eau de baryte chaude jusqu'à presque saturation de l'acide, et le précipité de

BaSO⁴ est séparé par filtration. Le filtrat est bouilli avec une pincée de BaCO³ jusqu'à neutralisation complète, et filtré bouillant. Après concentration assez forte, le nouveau filtrat, où doit se trouver à l'état de liberté le glyocolle éventuel, est bouilli un instant puis digéré au bain-marie pendant 2 heures avec de l'oxyde de cuivre précipité. On n'obtient aucune dissolution de l'oxyde de cuivre. Le liquide d'hydrolyse ne renferme donc pas de glyocolle : la matière insoluble obtenue dans la réaction du glucose sur le glyocolle en excès ne contient donc ni cyclo-polyglycyl-glycine, ni aucun autre produit de condensation glycylique susceptible de régénérer le glyocolle par hydrolyse.

Conclusions. — L'expérience qui vient d'être décrite a été répétée à trois reprises, toujours avec les mêmes résultats. Je n'ai pu déceler, ni aucune substance biurétique, ni aucun produit de condensation glycylique hydrolysable, ni aucune parcelle de cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine).

Je n'oserais affirmer cependant qu'il ne puisse se produire une trace de ce dernier corps. Dans l'une des trois expériences j'ai remarqué, pendant le chauffage à 170°, peu intense mais nette, l'odeur qui accompagne la production de cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine) au sein de la glycérine. Sur la masse brune refroidie apparaissaient, dans cette même expérience, des traces d'efflorescences blanches semblables à celles que forment les fines aiguilles sublimées de la cyclo-glycyl-glycine. Il s'agissait peut-être de cette substance, bien que je n'aie pu l'extraire en nature ; mais il est certain qu'elle ne serait apparue ici qu'à titre accessoire.

On voit que, même dans le cas où le glucose rencontre une quantité de glyocolle telle que, une portion de l'acide aminé étant consommée par le blocage de la fonction aldéhydique, il en reste encore un excès libre, la réaction aboutit toujours à la formation des produits mélanoidiques. L'excès d'acide aminé se retrouve inaltéré : il n'a donc pas rencontré de fonctions sur quoi réagir ; en particulier il n'a pas trouvé d'oxhydriles pour l'éthérifier. On en conclut que la perte des oxhydriles du glucose, c'est-à-dire la déshydratation de celui-ci pour la formation des produits mélanoidiques, est obligatoire, et contemporaine de la réaction de la fonction aldéhydique avec la fonction aminée du glyocolle.

La présence de la fonction aldéhydique (ou cétonique, comme nous le verrons plus loin) imprime donc à la molécule du sucre un caractère tout particulier qui paralyse sa fonction d'alcool, au moins vis-à-vis du glyocolle (et des autres acides aminés, comme on le verra plus loin).

Dans les conditions où j'ai étudié la réaction, les sucres se comportent tout autrement que la glycérine, et ne sauraient être considérés comme des agents de condensation peptidogène. J'entends cependant limiter étroitement la portée de mes conclusions au champ de mes constatations, et ne prétends nullement affirmer que *dans les conditions où les acides aminés rencontrent les sucres chez les organismes vivants*, ces alcools complexes ne pourraient jouer, eux aussi, un rôle protéogène analogue à celui de la glycérine.

CHAPITRE XIX

ACTION DE DIVERS SUCRES SUR DIVERS ACIDES AMINÉS

Après avoir établi l'action aussi facile qu'intéressante du d.glucose sur le glyocolle, je me suis aussitôt occupé de rechercher si, comme il était à prévoir, ces phénomènes peuvent se généraliser à la famille des acides aminés d'une part, à la famille des sucres d'autre part.

J'ai donc étudié successivement l'action du d.glucose sur divers aminoacides, puis l'action de divers sucres sur le glyocolle.

Action du d.glucose sur divers acides aminés, vers 100°.—

Les divers aminoacides dont je disposais pour cette expérience étaient le *glyocolle* (obtenu synthétiquement à partir de l'acide monochlor-acétique), la *sarcosine* (obtenue par décomposition barytique de la caféine), la *d.alanine*, la *d.valine*, la *l.leucine* (isolées toutes trois des produits d'hydrolyse de la corne), la *l.tyrosine* (extraite des résidus cristallins de la fabrication des peptones), l'*acide d.glutamique* (isolé des produits d'hydrolyse du gluten).

Une série de petits tubes à essai (environ 12 millimètres de diamètre et 8 centimètres de hauteur) sont installés dans une série de petits trous de diamètre correspondant percés dans le couvercle d'un bain-marie. Sept tubes reçoivent les quantités de substance que voici :

N° 1 : 0 gr. 05 glyocolle	+ 0 gr. 20 glucose	+ 0 cc. 5 eau
N° 2 : 0 gr. 05 sarcosine	+ 0 gr. 20 »	+ 0 cc. 5 »
N° 3 : 0 gr. 05 alanine	+ 0 gr. 20 »	+ 0 cc. 5 »
N° 4 : 0 gr. 05 valine	+ 0 gr. 20 »	+ 0 cc. 5 »
N° 5 : 0 gr. 05 leucine	+ 0 gr. 20 »	+ 0 cc. 5 »
N° 6 : 0 gr. 05 tyrosine	+ 0 gr. 20 »	+ 0 cc. 5 »
N° 7 : 0 gr. 05 ac. glutamiqu.	+ 0 gr. 20 »	+ 0 cc. 5 »

Le bain-marie étant en ébullition, on place le couvercle garni des

7 tubes, qu'on agite individuellement de temps en temps pour favoriser la dissolution des substances pulvérisées.

Après 10 minutes, on observe des traces de coloration jaune dans le tube 1 (glycocolle).

Après 15 minutes, on a une très légère coloration jaune dans 4 tubes, qui sont par ordre d'intensité les nos 1 (glycocolle), 3 (alanine), 4 (valine), 2 (sarcosine), ce dernier étant encore à la limite de perceptibilité de la réaction.

Après 25 minutes, la teinte s'est accrue dans les tubes 1 (glycocolle), 3 (alanine), 4 (valine). Les tubes 2 (sarcosine) et 7 (acide glutamique) offrent une coloration nette. Les tubes à leucine et à tyrosine ne présentent encore aucune coloration; mais il faut remarquer que la faible solubilité de ces substances doit apporter un retard très sérieux dans la réaction. Un retard du même genre ralentit, dans les premiers temps, les réactions de la valine et de l'acide glutamique.

Après 1 heure, les colorations s'accroissent et s'échelonnent dans l'ordre suivant : glycocolle, alanine, valine, acide glutamique, sarcosine, leucine. Le tube à tyrosine est encore incolore.

Ensuite on voit l'alanine passer au premier rang. Après 1 heure 30 minutes, on distingue un groupe de tubes à coloration très forte (alanine, glycocolle, valine), un tube à coloration moyenne (acide glutamique), des tubes à coloration très faible (sarcosine, leucine), un tube à coloration nulle (tyrosine).

Après 1 heure 40 minutes, on constate que le tube à alanine se met à mousser abondamment (CO_2). Les tubes à glycocolle et à valine sont très bruns, sans mousse. Le tube à acide glutamique est brun-jaune. Les tubes à sarcosine et à leucine sont de teinte très faible; le tube à tyrosine, de teinte nulle.

Ensuite la réaction de la valine dépasse en activité celle du glycocolle, et mousse avant celle-ci.

Enfin, tous les tubes montrent à la longue le dégagement de CO_2 , se dessèchent et ne laissent plus que des résidus brun-noir qui sont tous à peu près identiques d'aspect.

On peut donc, d'après cette expérience, sérier ainsi l'activité de réaction des divers aminoacides, à poids égal, en présence du glucose :

Alanine (d.),
Valine (d.),
Glycocolle,
Acide glutamique (d.),
Leucine (l.),
Sarcosine,
Tyrosine (l.).

Il résulte de cette série d'expériences, qu'en présence du glucose, *l'alanine est le plus actif des acides aminés*, de ceux du moins dont j'ai pu étudier l'allure. Cette activité de l'alanine n'est pas faite pour surprendre, si l'on songe que cette molécule possède certainement dans sa structure quelque chose de particulier qui lui permet, soit de former des dérivés aussi nombreux qu'intéressants par leur rôle biologique (sérine, cystéine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine), soit de prendre part aux réactions les plus fondamentales de la vie, sur lesquelles nous ne saurions nous étendre ici.

Action de divers sucres sur le glyocolle, vers 100°. —

L'expérience est disposée comme la précédente, dans une série de petits tubes qui traversent le couvercle d'un bain-marie, et où l'on met le glyocolle en présence des sucres suivants : *arabinose*, *xylose* (échantillons très purs des deux pentoses, préparés au laboratoire); *glucose*, *mannose*, *galactose*; *fructose*; *maltose*, *lactose*, *saccharose* (les 7 derniers sucres étaient des échantillons purs du commerce). Les 9 tubes sont chargés de la manière suivante :

N° 1 : 0 gr. 20	glyocolle + 0 gr. 80	arabinose + 2 cc. eau
N° 2 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	xylose + 2 cc. »
N° 3 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	glucose + 2 cc. »
N° 4 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	mannose + 2 cc. »
N° 5 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	galactose + 2 cc. »
N° 6 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	fructose + 2 cc. »
N° 7 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	maltose + 2 cc. »
N° 8 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	lactose + 2 cc. »
N° 9 : 0 gr. 20	» + 0 gr. 80	saccharose + 2 cc. »

Le bain-marie étant en pleine ébullition, on y place le couvercle muni des 9 tubes à réaction, que l'on agitera individuellement de temps en temps pour favoriser la dissolution.

Après 5 minutes, les tubes à xylose et à arabinose sont déjà d'un brun jaunâtre *très intense*; les tubes à fructose, galactose, mannose, offrent une légère coloration jaune déjà bien nette; le tube à glucose commence à laisser soupçonner la réaction; les tubes à maltose, lactose, saccharose, ne montrent rien.

Après 15 minutes, on observe la même série de teintes, plus accentuées.

Après 25 minutes, on peut diviser les sucres en 4 groupes. Les tubes à pentoses (xylose en tête, puis arabinose) sont d'un brun très foncé et *dégagent déjà le gaz carbonique*. Les hexoses montrent des colo-

rations déjà bien accentuées, et rangées dans l'ordre suivant : fructose, galactose, mannose, glucose. Les bihexoses *réducteurs* offrent une légère teinte, plus accentuée pour le lactose que pour le maltose. Le tube à saccharose est parfaitement incolore.

Après 1 heure 10 minutes, la réaction avec le saccharose est encore complètement nulle : les autres se poursuivent dans le même ordre que précédemment.

Après 3 heures, le tube à saccharose commence seulement à jaunir très légèrement, alors que les autres ont pris déjà des colorations très foncées.

Même après 4 heures 1/2 de séjour sur le bain-marie bouillant, le tube à saccharose n'est pas plus coloré que le tube à glucose au bout d'une dizaine de minutes.

Cette série montre avec évidence que, seul de tous les sucres expérimentés, le saccharose, sucre non réducteur, est incapable de réagir avec l'acide aminé. Si après 3 heures de séjour sur le bain-marie on voit néanmoins une réaction commencer, très péniblement du reste, c'est évidemment parce que le saccharose commence à subir une hydrolyse qui le dédouble en ses deux constituants réducteurs, le fructose et le glucose, qui sont, eux, parfaitement aptes à réagir.

La présente série démontre donc définitivement ce que nous avons admis plus haut, à savoir que *la présence, à l'état de liberté, de la fonction aldéhydrique (ou cétonique) est indispensable à la réaction des sucres sur les acides aminés, en ce qui concerne au moins la production des matières brunes et le dégagement d'anhydrique carbonique.*

Néanmoins le reste de la molécule peut influencer considérablement, sinon le sens, au moins la vitesse des phénomènes : nous en trouvons la preuve dans le cas des pentoses (xylose surtout, puis arabinose), chez lesquels la réaction s'amorce et se poursuit avec une facilité vraiment extraordinaire.

Action du glycocolle sur le xylose, à 40°. — On a vu dans le chapitre précédent que l'action du glycocolle sur le glucose est encore très facile à mettre en évidence à la température 40°, quoique beaucoup moins rapide qu'aux températures élevées. Etant donnée la sensibilité toute particulière des pentoses, que je viens d'établir, j'ai pensé que, même à 40°, la réaction du xylose avec le glycocolle devrait être plus rapide que celle du glucose avec le même aminoacide.

Dans un petit vase j'ai dissous 0 gr. 5 de glycocolle dans 3 cc. d'eau, puis j'ai ajouté 2 gr. de xylose pulvérisé, et j'ai placé le mélange dans une étuve bien réglée à 40°, à côté d'un mélange tout semblable préparé

à l'aide du glucose (1). Voici les observations comparatives relevées sur les deux mélanges en expérience.

Durée du séjour à 40°	Xylose et glycocolle	Glucose et glycocolle
20 heures.	Teinte madère.	Rien.
27 heures.	Brun accentué.	Jaune naissant.
44 heures.	Brun très foncé ; abondante vacuolisation par CO ² .	Orangé foncé.
68 heures.	Brun très foncé ; vacuolisation très abondante par CO ² .	Brun clair ; nombreuses petites bulles de CO ² .
87 heures.	Brun très foncé ; production de CO ² très abondante.	Brun foncé ; nombreuses bulles de CO ² .

Dans cette expérience il suffit de 44 heures avec le xylose pour porter le mélange à peu près au même état qu'on observe avec le glucose au bout de 87 heures : la réaction marche ici approximativement 2 fois plus vite dans le cas du pentose que dans le cas de l'hexose.

Action du glycocolle sur le xylose, à 34°. — Enfin, de même que pour l'action du glycocolle sur le glucose (2), j'ai étudié encore l'action du glycocolle sur le xylose à 34°. Deux petits vases semblables recevaient chacun 0 gr. 5 de glycocolle et 3 cc. d'eau ; puis, après dissolution, on ajoutait 2 gr. de l'un ou l'autre sucre ; les deux mélanges étaient maintenus côte à côte dans une étuve bien réglée à 34°. Voici les observations comparatives pour les premiers stades des transformations :

Durée du séjour à 34°	Xylose et glycocolle	Glucose et glycocolle
20 heures.	Teinte madère.	Rien.
27 heures.	Brun clair.	Rien.
35 heures.	Brun accentué.	Rien.
44 heures.	Brun accentué.	Jaune pâle.
68 heures.	Brun foncé ; aucune bulle de CO ² .	Jaune orangé.
87 heures.	Brun très foncé ; grosses bulles de CO ² .	Teinte madère.
110 heures.	Brun très foncé ; nombreuses bulles.	Brun clair.

(1) Voir antérieurement, page 303.

(2) Voir antérieurement, page 304.

Ici encore la réaction avec le xylose est remarquable par sa facilité; il faut moins d'une journée pour obtenir spontanément une production très appréciable de matières brunes.

CHAPITRE XX

ACTION DES SUCRES SUR CERTAINS POLYPEPTIDES

Recherche de la réaction sur les chaînes polypeptidiques.

— La réaction si intense et si générale que j'ai signalée entre les sucres réducteurs et les acides aminés, repose vraisemblablement, comme je l'ai exposé, sur l'union du groupement NH^2 de l'acide aminé avec le groupement aldéhydique ou cétonique du sucre. Cette union peut se concevoir avec ou sans déshydratation, mais elle doit créer dans la molécule des conditions nouvelles qui confèrent au carboxyle terminal une fragilité particulière, et provoquent sa rupture sous forme de CO^2 .

Etant donnée la facilité de ces transformations en ce qui concerne les acides aminés, je me suis demandé si cette propriété se conserverait dans le cas où les deux fonctions NH^2 et COOH sont séparées dans la molécule par une distance plus considérable. Un cas particulier d'importance toute spéciale pour l'étude des phénomènes naturels est celui où ces deux fonctions sont séparées par une liaison $-\text{CO}-\text{NH}-$, c'est-à-dire le cas où les deux fonctions n'appartiennent plus à la même molécule d'acide aminé, mais représentent au contraire les deux extrémités d'une chaîne polypeptidique.

Les polypeptides peuvent-ils, vis-à-vis des sucres réducteurs, se comporter comme les acides aminés eux-mêmes, et contribuer à la formation des matières humiques?

Telle est l'importante question dont j'ai commencé l'étude (1) en m'adressant au plus simple des polypeptides, à la glycyl glycine.

Action de la glycyl-glycine sur le xylose, à 75° . — La glycyl-glycine $\text{H}^2\text{N}.\text{CH}^2.\text{CO} - \text{NH}.\text{CH}^2.\text{COOH}$ employée pour ces expé-

(1) L.-C. MAILLARD. Formation de matières humiques par action de polypeptides sur les sucres (*C. R. Acad. Sc.*, 156, 1159, 1913).

riences provenait de l'ouverture (procédé de E. FISCHER par la soude à froid) de la molécule de cyclo-glycyl-glycine préparée par ma méthode personnelle. Elle était débarrassée de la soude par l'acide acétique, comme je l'ai expliqué (1). J'ai d'ailleurs pris soin de contrôler sa pureté, et notamment l'absence complète de l'acétate de sodium : en calcinant un peu de la substance avec un excès d'acide sulfurique dans un creuset de platine, on n'obtient pas la plus légère trace de résidu : quelques gouttes d'eau, versées dans le creuset refroidi, ne présentent pas trace de louche avec BaCl^2 .

Dans un petit vase cylindrique on introduit 0 gr. 5 de glycyl-glycine pure avec 3 cc. d'eau ; on place sur le couvercle d'un bain-marie, zone où le thermomètre indique une température voisine de 75° ; puis, dès la dissolution effectuée, on ajoute 2 gr. de xylose, et on agite pour dissoudre le sucre aussi rapidement que possible. On fait alors les observations que voici :

Après :

12 minutes à 75° .	. . .	Coloration jaune bien nette.
15 minutes	» . . .	Coloration jaune forte.
20 minutes	» . . .	Coloration jaune très forte, presque brune.
23 minutes	» . . .	Mélange brun, opaque.
1 h. 52 min.	» . . .	Début des fines bulles de CO^2 .
2 h. 5 min.	» . . .	Dégagement de CO^2 dans toute la masse, qui devient pâteuse.

Le lendemain, en ajoutant un peu d'eau pour remplacer celle qui s'est évaporée, on constate qu'une partie de la masse brune est déjà devenue insoluble dans l'eau chaude ; en maintenant l'essai sur le bain-marie (75° environ) et remettant de temps à autre quelques gouttes d'eau, on obtient en quelques jours l'insolubilisation de toute la masse, exactement comme dans le cas du glycocolle.

La matière brune résultant de l'action de la glycyl-glycine sur le xylose rappelle de très près, par ses propriétés, celle que nous avons étudiée plus haut comme résultant de l'action du glycocolle sur le glucose. Insoluble comme elle dans l'eau même bouillante et dans les solutions acides, elle se dissout un peu dans l'ammoniaque, même à froid ; elle se dissout plus abondamment, mais partiellement encore, dans la potasse, même à froid. Les solutions alcalines, de couleur brune, laissent précipiter, par neutralisation, des flocons bruns de la substance. La matière brune se dissout dans l'acide sulfurique con-

1. Voir antérieurement, page 94.

centré, lentement à froid, très rapidement à chaud ; mais si l'on chauffe, elle attaque énergiquement l'acide sulfurique et produit un vif dégagement de SO^2 . Versée dans un excès d'eau, la solution sulfurique abandonne la substance en flocons noirâtres qui présentent à nouveau les propriétés de la matière originelle.

Action de la glycyl-glycine sur le glucose, à 75°. — Le glucose réagit moins vite que le xylose, mais à la manière habituelle.

Dans un petit vase cylindrique on introduit 0 gr. 5 de glycyl-glycine pure, avec 3 cc. d'eau ; on place sur le couvercle du bain-marie (75° environ) ; dès la dissolution effectuée, on ajoute 2 gr. de glucose, et on agite pour dissoudre le sucre.

Après :

20 minutes à 75°.	. . .	Légère teinte ambrée.
23 minutes	» . . .	Jaune pâle.
35 minutes	» . . .	Teinte madère.
40 minutes	» . . .	Brun clair.
50 minutes	» . . .	Brun foncé, aucun dégagement de CO^2 .
1 h. 50 min.	» . . .	Fines bulles de CO^2 (début).
2 h. 40 min.	» . . .	Dégagement de CO^2 dans toute la masse, qui devient pâteuse.

Au bout de 25-30 heures environ de séjour sur le bain-marie (75°), on commence à remarquer l'insolubilisation d'une partie de la masse brune ; en remettant un peu d'eau puis laissant évaporer, et ainsi de suite, on transforme en quelques jours la totalité du produit en matière insoluble.

Cette matière brune présente exactement le même aspect et la même consistance membraneuse que celle qui provenait de l'action du glycolle lui-même sur le glucose. Comme elle, elle se montre insoluble dans l'eau, même bouillante ; elle se dissout un peu dans l'ammoniaque, soit à froid, soit à chaud ; elle se dissout partiellement dans la potasse, froide ou chaude, en donnant un liquide brun foncé dont la neutralisation par les acides précipite des flocons bruns. La matière brune, insoluble dans les acides étendus, se dissout dans l'acide sulfurique concentré : lente à froid, cette dissolution devient très rapide si l'on chauffe, mais en même temps la matière brune réduit énergiquement l'acide sulfurique et produit un vif dégagement d'anhydride sulfureux. Versée dans un excès d'eau, la solution sulfurique laisse précipiter la matière en flocons d'un brun noirâtre. L'allure de la matière brune obtenue par action de la glycyl-glycine sur le glucose est donc exactement semblable à celle de la matière obtenue à l'aide de la glycine elle-même.

Action de la glycyl-glycine sur le xylose, à 40°. — Dans un petit vase cylindrique, on introduit 0 gr. 5 de glycyl-glycine pure avec 3 cc. d'eau, on chauffe légèrement pour faciliter la dissolution, on laisse refroidir et seulement alors on ajoute 2 gr. de xylose puis on porte dans une étuve réglée à 40°. Les observations ont été relevées comparativement avec celles d'une réaction de glycolle sur xylose, installée dans la même étuve (1).

Durée du séjour à 40°	Glycyl-glycine et xylose	Glycolle et xylose
20 heures.	Brun foncé déjà opaque.	Teinte madère.
27 heures.	Brun noirâtre.	Brun accentué.
44 heures.	Brun noirâtre; vacuolisation par CO ² déjà très nette.	Brun très foncé; abondante vacuolisation par CO ² .
68 heures.	Brun noirâtre; vacuolisation abondante.	Brun très foncé; vacuolisation très abondante.

On voit que même à 40°, la glycyl-glycine, en agissant sur le xylose, détermine les mêmes phénomènes que le glycolle, à savoir la production de matières brunes et le dégagement de CO². On remarque cependant que la production des matières brunes est plus précoce encore avec la glycyl-glycine qu'avec le glycolle; tandis que le dégagement de CO² est plus tardif.

Action de la glycyl-glycine sur le glucose, à 40°. — Dans un petit vase cylindrique, on introduit 0 gr. 5 de glycyl-glycine avec 3 cc. d'eau, on chauffe légèrement pour faciliter la dissolution, on laisse refroidir, et seulement alors on ajoute 2 gr. de glucose puis on porte dans l'étuve réglée à 40°. A côté de cet essai, en a été installé un autre monté avec le glycolle (2). Voici les observations comparatives :

Durée du séjour à 40°	Glycyl-glycine et glucose	Glycolle et glucose
20 heures	Teinte madère.	Rien.
27 heures	Brun clair.	Jaune naissant.
44 heures	Brun foncé.	Orangé foncé.
68 heures	Brun très foncé, pas de CO ² .	Brun clair, nombreuses petites bulles de CO ² .
87 heures	Brun très foncé, pas de CO ² .	Brun foncé, nombreuses bulles de CO ² .
110 heures	Brun très foncé, pas de CO ² .	Brun foncé, abondant dégagement de CO ² .
135 heures	Brun très foncé, quelques fines bulles de CO ² .	Brun foncé, abondant dégagement de CO ² .

(1) Voir antérieurement, page 339.

(2) Voir antérieurement, page 303.

Ici encore, avec le glucose, on voit que la glycyl-glycine détermine la coloration brune beaucoup plus précocement que ne le fait le glycolle lui-même, et qu'en revanche le dégagement de CO^2 est beaucoup plus tardif. Mais les deux phénomènes se produisent régulièrement sous l'action du dipeptide.

Action de la glycyl-glycine sur le xylose, à 34° . — Dans un petit vase cylindrique on introduit 0 gr. 5 de glycyl-glycine avec 3 cc. d'eau, on chauffe légèrement pour faciliter la dissolution, on laisse refroidir, et seulement alors on ajoute 2 gr. de xylose puis on porte dans une étuve bien réglée à 34° . Cette expérience a eu lieu simultanément avec une autre où le xylose était en présence de glycolle (1).

Durée du séjour à 34°	Glycyl-glycine et xylose	Glycolle et xylose
20 heures	Brun clair.	Teinte madère.
27 heures	Brun accentué.	Brun clair.
35 heures	Brun foncé.	Brun accentué.
44 heures	Brun très foncé, pas de bulles.	Brun accentué.
68 heures	Brun très foncé, pas de bulles.	Brun foncé, pas de bulles.
87 heures	Brun très foncé, pas de bulles.	Brun très foncé, grosses bulles de CO^2 .
110 heures	Brun très foncé, pas de bulles.	Brun très foncé, nombreuses bulles.
135 heures	Brun très foncé, pas de bulles.	Brun très foncé, nombreuses bulles.

L'expérience n'a pas été prolongée davantage : bien que le développement de la coloration brune, dans le cas de la glycyl-glycine, soit plus rapide que dans le cas du glycolle, le dégagement de CO^2 est plus tardif et n'a même pas été atteint dans les limites de l'expérience. Il a été constaté plus tard.

Action de la glycyl-glycine sur le glucose, à 34° . — Dans un petit vase cylindrique on introduit 0 gr. 5 de glycyl-glycine avec 3 cc. d'eau, on chauffe légèrement pour faciliter la dissolution, on laisse refroidir, et seulement alors on ajoute 2 gr. de glucose puis on porte dans l'étuve à 34° . L'expérience a lieu comparativement avec une autre où le glucose était en présence de glycolle (2).

1. Voir antérieurement, page 339.

2. Voir antérieurement, page 304.

Durée du séjour à 34°	Glycyl-glycine et glucose	Glycocolle et glucose
20 heures	Rien.	Rien.
27 heures	Rien.	Rien.
35 heures	Jaune pâle.	Rien.
44 heures	Orangé clair.	Jaune pâle.
68 heures	Brun clair.	Jaune orangé.
87 heures	Brun foncé.	Teinte madère.
110 heures	Brun très foncé, pas de bulles.	Brun clair.
135 heures	Brun très foncé, pas de bulles.	Brun foncé.

Ici encore, à 34° en présence du glucose, la coloration brune s'est développée plus rapidement sous l'action de la glycyl-glycine que sous celle du glycocolle lui-même, mais le stade du dégagement de CO² n'a pas été atteint dans les limites de l'expérience. Il a été cependant constaté plus tard.

Action des peptones sur les sucres. — L'expérience a donc établi qu'un dipeptide, la glycyl-glycine, est capable d'agir sur les sucres à la façon d'un aminoacide libre : il se produit rapidement des matières brunes, puis un dégagement d'anhydride carbonique qui vraisemblablement répond, comme dans le cas de l'acide aminé, à la rupture du carboxyle terminal de la chaîne dipeptidique.

La voie se trouve donc dès à présent ouverte, et l'on est en droit de rechercher, en multipliant sur diverses substances des essais du même genre, jusqu'où peut s'étendre cette propriété dans la famille des polypeptides et des matières protéiques.

En attendant d'avoir à ma disposition une série suffisante de polypeptides purs, je me suis borné à chercher si l'on peut obtenir la formation de matières humiques en utilisant de simples *peptones*, qui renferment comme on le sait des mélanges de polypeptides plus ou moins complexes. Je ne donne, bien entendu, qu'à titre tout provisoire, ces expériences ; elles ne sauraient avoir une valeur définitive que si nous connaissions exactement la composition de ces peptones, et si nous étions sûrs qu'elles ne contiennent point d'acides aminés libres.

Les peptones commerciales que j'ai étudiées étaient au nombre de trois : une peptone granulée, de teinte légèrement jaunâtre, que je désigne ici par la lettre P ; une peptone de Witte, que je désigne par la lettre W ; et une peptone d'albumine, bien blanche, que je représente par la lettre A.

De chacune des peptones, 1 gr. a été placé dans un petit vase avec 2 gr. d'un sucre (tantôt xylose, tantôt glucose) et la petite quantité

d'eau chaude nécessaire pour la dissolution (3-5 cc.). Tous les essais ont été placés côte à côte dans une étuve réglée d'avance à 108°-110°. Voici d'abord les essais au xylose (PX, WX, AX) :

Action des peptones sur le xylose, à 110°

Après 45 minutes	{ PX : brun, nombreuses fines bulles. { WX : brun, début des bulles. { AX : brun, pas de bulles.
Après 1 h. 30 m.	{ PX : brun foncé, abondante mousse de CO ² . { WX : brun foncé, abondante mousse de CO ² . { AX : brun foncé, pas de bulles.
Après 3 heures	{ PX : pâte épaisse, volumineuse, très vacuolisée. { WX : pâte épaisse, volumineuse, très vacuolisée. { AX : pâte très vacuolisée de fines bulles.

L'action de ces mêmes peptones sur le glucose est un peu moins rapide, ainsi qu'on pourra le constater d'après les essais suivants (PG, WG, AG) qui étaient disposés dans l'étuve à côté des précédents :

Action des peptones sur le glucose, à 110°

Après 45 minutes	{ PG : brun, pas de bulles. { WG : rien. { AG : rien.
Après 1 h. 30 m.	{ PG : brun foncé, mousse notable. { WG : brun clair, pas de bulles. { AG : brun clair, pas de bulles.
Après 3 heures	{ PG : pâte épaisse, volumineuse, grandes bulles. { WG : brun foncé, grandes bulles abondantes. { AG : brun foncé, très vacuolisé de fines bulles

La réaction universelle des acides aminés sur les sucres réducteurs, avec formation de matières humiques brunes et dégagement d'anhydride carbonique, se retrouve donc chez les trois échantillons de peptones étudiés, sans qu'il soit possible d'avoir une opinion sur l'ordre de grandeur des polypeptides auxquels elle peut être due.

CHAPITRE XXI

RELATIONS, AVEC DIVERSES SUBSTANCES DE CONSTITUTION INCONNUE, DES PRODUITS D'ACTION DES ACIDES AMINÉS SUR LES SUCRES

Relations avec les substances caramélisées. — Lorsqu'on fait réagir au bain-marie (ou même à 34°) le glyocolle sur le glucose, on perçoit une odeur très nette de caramel pendant la première période du phénomène, celle où a lieu l'apparition des produits bruns solubles et le dégagement d'anhydride carbonique. L'aspect lui-même du mélange rappelle de très près le caramel, et engage à rechercher si cette analogie d'apparence repose sur une analogie chimique.

On connaît depuis longtemps la formation du caramel par la décomposition des sucres sous l'action de la chaleur : E. PÉLIGOT (1) a montré que si l'on chauffe le sucre ordinaire (saccharose) à 180° seulement, il se contente de fondre en un liquide visqueux incolore ; mais si on dépasse cette température, le sucre brunit et perd de l'eau. Maintenu à 210°-220°, le sucre se boursoufle, dégage une grande quantité de vapeur d'eau, et prend une teinte brune de plus en plus accentuée : le produit brun est entièrement soluble dans l'eau, insipide, précipitable par l'alcool qui élimine les traces de sucre et la substance amère accessoire. A cette matière brune considérée comme substance définie et unique, le *caramel*, E. PÉLIGOT reconnaît une composition qu'exprime notre formule moderne $C^{12}H^{18}O^9$: le phénomène qui a transformé le saccharose en caramel est donc une *déshydratation pure et simple*, perte de $2H^2O$ pour 1 molécule $C^{12}H^{22}O^{11}$. E. PÉLIGOT a fait des constatations parallèles sur le glucose (sucres d'amidon, de diabète, et de raisins).

1. E. PÉLIGOT. Recherches sur la nature et les propriétés chimiques des sucres (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 2° s., 67, 443, 1838).

VOELCKEL (1), répétant et confirmant les observations de E. PÉLIGOT, attribue à la substance brune, considérée comme unique, la désignation de *caramélane* et la formule $C^{24}H^{26}O^{13}$ (f. modernisée), qui exprime la perte de $9H^2O$ par 2 molécules $C^{12}H^{22}O^{11}$, soit la perte de 4 1/2 molécules d'eau par molécule de saccharose.

Les connaissances plus détaillées que nous possédons sur les matières caramélisées sont, elles aussi, très anciennes, puisqu'elles remontent à A. GÉLIS (2). Cet auteur a reconnu la multiplicité des substances qui prennent naissance dans la caramélisation du saccharose. La plus précoce est la *caramélane* (différente de celle de VOELCKEL) soluble dans l'alcool à 84° qui permet de l'extraire des mélanges, très soluble dans l'eau, très déliquescente, de saveur très amère, répondant à la formule $C^{12}H^{18}O^9$ (f. modernisée) qui traduit la perte de $2H^2O$ par molécule de saccharose. La caramélane, chauffée à 190° , continue à perdre de l'eau pour donner les produits bruns plus avancés ; ses solutions n'ont qu'une teinte jaune qu'on peut même leur enlever par le noir animal (3), preuve que la caramélane de A. GÉLIS ne doit pas compter encore parmi les produits bruns caractéristiques du caramel.

Le caramel, épuisé par l'alcool à 84° , lui cède la caramélane, et le résidu se dissout en partie dans l'eau froide : on a une solution presque pure de *caramélène*. Cette solution est évaporée à sec ou précipitée par l'alcool absolu, puis on reprend par l'eau froide qui ne dissout que la caramélène en laissant un petit résidu de caraméline entraînée. La caramélène sèche est brillante et cassante, de couleur brun-roux, non déliquescente mais soluble dans l'eau qu'elle colore intensément : soluble dans l'alcool faible, l'alcool fort n'en dissout que des traces. La caramélène réduit la liqueur cupro-potassique. Elle a pour formule $C^{36}H^{30}O^{25}$ (f. modernisée), ce qui répond à la perte de $8H^2O$ par 3 molécules $C^{12}H^{22}O^{11}$, ou 2 2/3 molécules H^2O par molécule de saccharose.

Après que le caramel a cédé à l'alcool à 84° la caramélane, puis à l'eau froide la caramélène, « le résidu est encore un mélange ; mais ce

1. VOELCKEL (*Ann. d. Chem. u. Pharm*, 75, 59, 1852).

2. A. GÉLIS. De l'action de la chaleur sur les matières organiques neutres ; existence dans le caramel de plusieurs substances colorées diverses, les unes solubles, les autres insolubles dans l'eau (*C. R. Acad. Sc.*, 45, 590, 1857). — Action de la chaleur sur l'amidon (*C. R. Acad. Sc.*, 45, 932, 1857). — Action de la chaleur sur les substances neutres organiques ; étude du caramel et des produits torréfiés (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 3^e s., 52, 352, 1858).

3. A. GÉLIS. Lettre de M. Gélis à MM. les rédacteurs des *Annales de Chimie et de Physique*, sur la nature du caramel (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 3^e s., 65, 496, 1862).

« mélange n'est pas aussi complexe qu'on pourrait le supposer au premier abord et en ne jugeant que d'après les apparences. Il ne contient qu'un seul corps, la *caraméline*, mêlée à des quantités variables de sucre plus ou moins charbonné; mais cette *caraméline* peut y exister à différents états isomériques et passer de l'un à l'autre état sous les influences les plus faibles, de telle sorte qu'elle se présente avec des propriétés diverses qui peuvent faire croire à la multiplicité des produits ».

A. GÉLIS a « pu étudier la *caraméline* sous trois états différents : 1° à un état A, où elle est soluble dans l'eau ; 2° à un état B, où elle est insoluble dans l'eau mais soluble dans d'autres dissolvants ; 3° à un état C, où elle est insoluble dans tous les dissolvants ordinaires. C'est à l'état B et C qu'elle se présente dans les résidus de caramel épuisés par l'eau froide. La *caraméline* C ne peut en être extraite, et on doit l'obtenir par d'autres moyens ; mais il n'en est pas de même de la modification B. Celle-ci peut en être séparée par l'eau bouillante, par l'alcool à 60° et par les liqueurs alcalines.

« Lorsqu'on traite par l'eau bouillante ces résidus qui contiennent la *caraméline* et qui sont insolubles dans l'eau froide, on obtient une liqueur colorée ; mais dans la formation de cette liqueur deux phénomènes se sont produits : la matière a d'abord été modifiée sous l'influence de l'eau bouillante, et ce n'est que parce que la *caraméline* B a passé à l'état A qu'il y a eu dissolution.

« La dissolution, une fois obtenue, reste colorée en se refroidissant, et n'abandonne que l'excès de la substance modifiée dont elle s'était saturée à chaud. On obtient, par conséquent, une dissolution permanente à froid. Lorsqu'on cherche à concentrer cette liqueur pour en retirer la *caraméline* A qui la colore, on la voit, à mesure que l'évaporation avance, se recouvrir d'une pellicule noire, qui peut être facilement enlevée au moyen d'un tube, comme on pourrait le faire de la pellicule que recouvre le lait bouilli. Si on enlève cette pellicule, elle se reforme sans cesse jusqu'à la fin de l'opération ».

Le corps qui constitue les pellicules a repassé à l'état de *caraméline* B, insoluble dans l'eau froide, et que l'eau bouillante peut modifier de nouveau. Si dans la solution de *caraméline* A, on verse de l'alcool, on obtient un abondant précipité, mais qui est repassé encore à l'état B.

La *caraméline* B est une belle matière noire à reflets brillants, qui possède la propriété curieuse d'être insoluble, soit dans l'eau, soit dans l'alcool à 90°, mais très soluble dans l'alcool à 60°. La *caraméline* B se dissout dans l'eau ammoniacale ou dans la potasse en formant des

liqueurs d'un brun très intense, semblables aux solutions d'ulmates alcalins. Les acides en séparent la caraméline B sous forme de flocons bruns insolubles. La caraméline, en milieu alcalin, réduit les sels de cuivre, d'or et d'argent.

Conservés à l'état humide, les échantillons de caraméline B deviennent partiellement insolubles dans l'eau bouillante ; séchés à 110°, ils y deviennent complètement insolubles, c'est alors la caraméline C.

Les diverses variétés de caraméline répondent, d'après les analyses de A. GÉLIS, à la formule $C^{96}H^{102}O^{54}$ (f. modernisée), qui traduit l'élimination de $37H^2O$ aux dépens de 8 molécules $C^{12}H^{22}O^{11}$, soit 4,625 molécules d'eau pour 1 molécule de saccharose.

Les recherches de A. GÉLIS nous montrent encore que la caramélisation consiste en une *déshydratation pure et simple* du sucre, à une température élevée dont l'optimum serait 190°. Une perte d'eau de 100/0 donne la caramélane presque pure ; une perte de 14-15 0/0 donne le produit qui contient le plus de caramélène ; une perte de 25 0/0 donne un résidu presque entièrement formé de caraméline. Le glucose fournit des produits très analogues à ceux qui dérivent du saccharose ; le traitement de l'amidon fournit de la *pyrodextrine*, dont les solutions aqueuses rappellent la teinte d'une infusion de café.

Maintenu à température plus basse (153°) pendant une semaine, le saccharose se transforme en *caraméline* noir-brun $C^{71}H^{40}O^2$ (E. MAUMENÉ).

E. MAUMENÉ (1) produit la caramélisation rapide du saccharose par chauffage à 120°-130° avec un excès de chlorure stanneux : la *caraméline* obtenue $C^{61}H^{40}O^2$, de couleur brun-noir, est insoluble dans l'eau, les acides et les alcalis. Le glucose, les dextrines, les celluloses, fournissent le même produit.

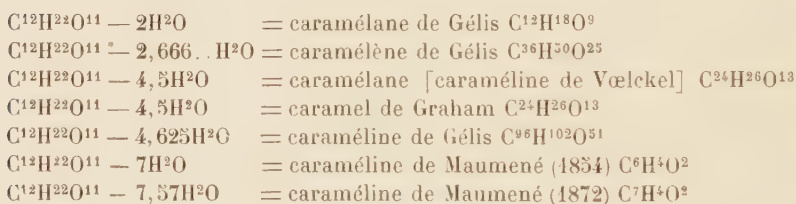
Il se peut d'ailleurs que l'identité de composition constatée par A. GÉLIS entre ses trois caramélines A, B, C, résulte, non d'une isomérisation chimique, mais seulement d'une variation d'agrégat physique portant sur une substance colloïdale. Le caramel figure en effet parmi les colloïdes étudiés par TH. GRAHAM (2) : le caramel brut produit par chauffage du sucre de canne à 210°-220° et placé sur le dialyseur, abandonne certaines matières colorées intermédiaires (caramélane et cara-

1. E. MAUMENÉ. Nouveau réactif (le chlorure d'étain) servant à faire reconnaître la présence du sucre dans les liquides et spécialement dans l'urine (*C. R. Acad. Sc.*, 30, 314, 1850). — De l'emploi du chlorure d'étain pour reconnaître le mélange de coton ou de lin avec la laine ou la soie (*C. R. Acad. Sc.*, 30, 447, 1850).

2. TH. GRAHAM. Mémoire sur la diffusion moléculaire appliquée à l'analyse (traduit de l'anglais) (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 3^e s., 65, 129, 1862).

mélène de GÉLIS) : il reste une solution très colorée de la substance fondamentale, solution qui par concentration dans le vide devient gommeuse, gélatineuse, et laisse une masse élastique d'un noir brillant. Entièrement desséché à froid, ce *caramel soluble* peut être chauffé à 120° sans cesser d'être soluble ; mais si la solution aqueuse est concentrée à chaud, le résidu est entièrement insolubilisé. Les deux formes, soluble et insoluble, du caramel colloïdal, ont d'après TH. GRAHAM la même composition, qui répondrait à la formule $C^{12}H^{20}O^{13}$. Le *caramel coagulé* peut recouvrer sa solubilité : dans la potasse étendue, il se gonfle, devient gélatineux, et se dissout à chaud ; l'acidification par l'acide acétique, et la dialyse, redonnent la solution primitive de caramel pur. Il est curieux de voir que TH. GRAHAM a lui-même fait remarquer l'analogie que le caramel sous sa forme insoluble présente avec la *houille* : la caramélisation pourrait bien être le premier degré de la formation charbonneuse. Nous aurons à revenir sur cette conception.

Le phénomène de déshydratation qui donne naissance aux substances caramélisées à partir du saccharose peut donc se résumer ainsi :



Bien entendu, tous les sucres éprouvent des transformations du même genre : par exemple le lactose, à 180° , donne le *lactocaramel* $C^6H^{10}O^5$ de LIEBEN (1856), soluble dans l'eau, et qui par long chauffage à 175° devient insoluble.

Si j'ai rappelé ici le caractère déshydraté et les propriétés physiques du caramel, c'est qu'on les retrouve très nettement sur les produits de réaction du glycocole sur le glucose : on y voit une première matière brune, soluble, se transformer en présence de l'eau, en une matière insoluble dans l'eau même bouillante et partiellement soluble dans la potasse. La première idée qui pourrait se présenter à l'esprit serait donc d'identifier plus ou moins complètement, avec le caramel, les produits de ma réaction.

Mais la réaction que j'ai décrite s'amorce en quelques minutes au bain-marie et parvient en quelques heures jusqu'aux substances les plus condensées ; elle a lieu même à 34° et probablement à tempéra-

ture plus basse encore, pourvu qu'on lui en laisse le temps, alors que dans les mêmes conditions, les échantillons témoins de sucres purs n'éprouvent aucune altération. La présence des acides aminés aurait donc au moins pour effet de favoriser considérablement la caramélisation des sucres.

Une explication de ce genre serait en apparence corroborée par l'emploi bien connu des alcalis pour faciliter la préparation du caramel. L'industrie utilise depuis longtemps cette propriété, et l'on voit dès 1866 publier (Aszmusz (1) des recettes consistant à prendre, pour 120 kilos de glucose, 3 kilos de soude caustique et 6 litres d'eau, ou 4 kilos de carbonate de soude cristallisé et 8 litres d'eau, ou encore 6 kilos de *carbonate d'ammonium* dans 6 litres d'eau. On pourrait donc se demander si les acides aminés, ammoniacaux complexes, ne joueraient pas un rôle tout à fait comparable à celui de l'ammoniaque carbonatée : pour ma part, je crois très possible et vraisemblable que le procédé au carbonate d'ammonium donne des substances brunes azotées voisines des miennes, et sans doute y aura-t-il lieu d'étudier ultérieurement la question.

Mais ce qui distingue précisément mes produits des constituants du caramel, c'est la présence de l'azote. Sans doute pourrait-on croire, à l'exemple de ce que pensent certains auteurs au sujet des matières humiques naturelles, que l'essentiel consiste dans les produits de transformation des sucres eux-mêmes, l'azote n'intervenant qu'à titre accessoire et surajouté, soit par neutralisation chimique d'une matière brune à caractère acide, soit par adsorption physique dans un complexe colloïdal. Il faudrait qu'une telle adsorption fût particulièrement énergique, car on sait avec quelle ténacité l'humus naturel retient son azote.

Quoi qu'il en soit, il est *certain* dans le cas de mes substances brunes synthétiques (et probable pour les matières humiques, que j'y crois identiques), que l'azote fait partie intégrante d'une véritable combinaison d'ordre chimique. Non seulement on ne peut plus régénérer du produit le glyocolle, par quelque moyen que ce soit ; mais la formation des matières brunes s'accompagne, comme on l'a vu, d'une rupture de la molécule aminoacide avec expulsion de CO_2 . On concevrait difficilement qu'un tel remaniement moléculaire pût être attribué à de simples phénomènes de salification ou d'adsorption colloïdale, et j'estime qu'il faut y voir la preuve d'une réaction chimique intramoléculaire parfaitement caractérisée.

1. ASZMUSZ. Sur la fabrication des couleurs de caramel. Voir *J. de Pharm. et Chim.*, 4^e s., 5, 319, 1867.

Relations avec les substances non azotées dites matières humiques artificielles. — A côté des constituants du caramel, il convient d'examiner les substances brunes, de constitution encore inconnue, qui prennent naissance dans l'action des acides ou des alcalis sur les sucres, et que l'on a pris l'habitude de désigner sous le nom de *matières ulmiques* ou de *matières humiques*, admettant ainsi d'une manière implicite (quoique peut être téméraire) leur identité avec les constituants naturels de l'humus.

Les matières *ulmiques* tirent leur nom du genre botanique *Ulmus* (orme), arbres d'où exsude fréquemment, par des lésions de l'écorce, un liquide dont la dessiccation laisse concréter une matière d'un brun noirâtre. VAUQUELIN (1) fit la première analyse de cette matière, à laquelle le nom d'*ulmine* fut ensuite donné par KLAPROTH (2), qui la redécouvrit sept ans plus tard. BERZÉLIUS (3), SMITHSON (4), TH. THOMSON (5) décrivent l'« ulmine », non seulement dans la matière exsudée des ulcérations de l'orme et d'autres arbres, mais aussi dans les écorces de pin, de quinquina, de chêne, de charme, de marronnier d'Inde : il est à craindre que la ressemblance de l'aspect et de certaines propriétés ait amené des confusions entre substances en réalité différentes et dont bon nombre dérivent des tannins.

H. BRACONNOT (6) de son côté avait extrait d'un terreau recueilli dans les racines creuses d'un vieil arbre, une substance soluble dans les alcalis, précipitable par les acides sous forme de flocons brun noirâtre, et qu'il crut par la suite pouvoir identifier à l'ulmine. Il retrouva l'« ulmine », non seulement dans les terreaux, mais aussi dans la tourbe (en grande abondance) et même dans un lignite. « Elle doit faire sans doute, dit-il, partie constituante de la terre d'ombre ; mais il m'a été de toute impossibilité de produire l'ulmine avec la houille » (7).

1. VAUQUELIN. Sur une maladie des arbres qui attaque spécialement l'orme, et qui est analogue à un ulcère (*Ann. de Chimie*, 21, 39, 1797).

2. KLAPROTH. *Gehlen's Journ.*, 4, 329, 1804.

3. J. J. BERZÉLIUS. *Afhandlingar*, 3, 347, 1810.

4. SMITHSON. *Phil. Trans.*, 1813, 64.

5. TH. THOMSON. *Annals of Philosophy*, 1, 23, 1813 ; *Annals of Philosophy*, 2, 11, 395, 1814. — TH. THOMSON. *Système de Chimie* (trad. franç.), Paris, 1818. Voir t. 4, p. 53.

6. H. BRACONNOT. Sur la force assimilatrice dans les végétaux (*Ann. de Chimie*, 61, 187, 1807).

7. H. BRACONNOT. — Mémoire sur la conversion du ligneux en gomme, en sucre, et en un acide d'une nature particulière, par le moyen de l'acide sulfurique ; conversion de la même substance ligneuse en ulmine par la potasse (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 12, 172, 1819).

C'est dans ce même mémoire (1) que pour la première fois H. BRACONNOT annonce qu'il est parvenu à produire artificiellement l'ulmine, par action ménagée de la potasse caustique sur la substance ligneuse : on chauffe dans un creuset de fer ou d'argent poids égaux de sciure de bois et de potasse, avec un peu d'eau ; aussitôt que la masse brassée se fluidifie, on ajoute de l'eau, et on obtient une solution brun foncé d'où les acides précipitent abondamment l'ulmine. La sciure de bois, le linge usé, fournissent plus du quart de leur poids d'ulmine artificielle sèche.

La première étude d'ensemble des matières qu'il convient de rapporter à l'ulmine est due à Polydore BOULLAY (2). Cet auteur admet la transformation journalière d'une foule de matières végétales en ulmine sous des influences très variées, la présence de l'ulmine dans la terre végétale, le fumier, les matières végétales incomplètement carbonisées, telles que les fumerons, etc..., son accumulation en dépôts immenses, soit dans la terre d'ombre, soit dans le terreau et la terre de bruyères, soit dans les tourbières. L'ulmine est le plus précieux engrais que l'on connaisse, l'engrais par excellence ; c'est à la tourbe, c'est à l'ulmine que la Hollande doit sa fertilité. En raison de sa facile combinaison aux alcalis qui la dissolvent tandis que les acides la reprécipitent, P. BOULLAY reconnaît à l'ulmine un caractère acide, et change son nom en celui d'*acide ulmique*.

P. BOULLAY a constaté que, non seulement le bois, mais aussi le sucre de raisins (glucose) fournit, sous l'action des alcalis chauds, de l'acide ulmique ; le sucre de canne ne subit pas cette transformation. Il découvre que l'acide ulmique est un des produits ordinaires de l'action des acides sulfurique ou chlorhydrique sur les matières végétales, bois, amidon, sucre de canne. L'action de l'acide sulfurique sur le sucre de canne est très énergique : la matière ne tarde pas à brunir, à se charbonner ; mais on peut toutefois, en saisissant le point convenable, en retirer un peu d'acide ulmique. Avec l'acide chlorhydrique concentré, la réaction est trop impétueuse ; mais au moyen de l'acide chlorhydrique faible et de la chaleur, on peut retirer du sucre de canne une proportion notable d'une matière brune en tout semblable à l'acide ulmique.

P. BOULLAY a eu le mérite d'écarter de l'acide ulmique une foule de

1. Voir p. 189. Conversion du corps ligneux en ulmine par l'action de la potasse.

2. BOULLAY Polydore. Dissertation sur l'ulmine (acide ulmique) et sur l'acide azulmique (Thèse Fac. Sciences Paris, 1830). Voir *Ann. de Chim. et Physiq.*, 2^e s., 43, 273, 1830 ; et *Journ. de Pharm.*, 16, 465, 1830.

produits résultant de l'action de l'air ou des corps oxygénés sur les extraits végétaux, les tannins, l'acide gallique et les gallates, etc... et qu'on avait d'abord confondus avec l'ulmine, par exemple lorsque DOEBEREINER (1) avait annoncé que le gallate d'ammoniaque, exposé à l'air, se transformait en ulmate d'ammoniaque.

D'autre part on désignait déjà sous le nom de substances *humiques* les matières brunes contenues dans les terreaux, les tourbes, etc., et que H. BRACNOTT avait cru pouvoir identifier à l'ulmine de l'orme. Des réserves formelles avaient été déjà élevées contre une assimilation hasardeuse : c'est ainsi que J. J. BERZÉLIUS (2) préférait donner à la substance des terres le nom particulier de « *gêine* », ne voulant pas l'identifier à l'ulmine ; la distinction de ces divers corps était aussi soupçonnée par J. B. DUMAS (3), affirmée par E. PÉLIGOT (4). Nous verrons que la distinction paraît bien s'imposer entre les matériaux de l'humus naturel, que nous étudierons au paragraphe suivant, et les produits *non azotés* résultant de l'altération des sucres par les acides ou les alcalis, produits qui seuls font l'objet du présent paragraphe.

La formation des matières brunes par action des acides ou des alcalis sur les sucres et les polysaccharides a fait l'objet, il y a trois quarts de siècle, d'une série de travaux, non seulement ceux de H. BRACNOTT et de P. BOULLAY, mais aussi ceux de J. MALAGUTI (5), J. LIEBIG (6), CHEVREUL, E. PÉLIGOT (7), STEIN, G. J. MULDER (8), etc., dans le détail desquels on ne saurait entrer, leur intérêt étant surtout d'ordre historique. Les conceptions les plus connues sont celles de MULDER, dont la science s'est contentée pendant longtemps, faute de trouver des chimistes assez hardis pour s'attaquer encore à la solution de ces problèmes diffi-

1. DOEBEREINER. Conversion de l'acide gallique en ulmine (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 2^e s., 24, 335, 1823).

2. J. J. BERZÉLIUS. *Traité de Chimie* (trad. franç.), Paris, 1831. Voir t. 5, p. 549 ; et t. 6, p. 573.

3. J. B. DUMAS. *Traité de Chimie appliquée aux arts*, Paris, 1835. Voir t. 5, p. 397.

4. E. PÉLIGOT. Recherches sur l'acide ulmique (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 2^e s., 73, 208, 1839).

5. J. MALAGUTI. Action des acides étendus sur le sucre (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 2^e s., 59, 407, 1835).

6. J. LIEBIG. Sur les phénomènes de la fermentation et de la putréfaction, et sur les causes qui les provoquent (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 2^e s., 71, 447, 1839).

7. E. PÉLIGOT. Recherches sur l'acide ulmique (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 2^e s., 73, 208, 1839).

8. G. J. MULDER. *Journ. f. prakt. Chem.*, 21, 203 et 321 ; *Ann. d. Chem. u. Pharm.*, 36, 243, 1840.

ciles et ingrats. L'ébullition prolongée des sucres avec les acides étendus fait, d'après cet auteur, perdre de l'eau à la molécule, qui se transforme d'autre part en acide glucique, acide formique, et matières fortement colorées, au nombre de quatre. Deux de ces produits ont été formés sans intervention de l'oxygène extérieur : bien qu'ayant perdu de l'eau, ils ont perdu relativement moins d'hydrogène que d'oxygène, et renferment maintenant plus d'hydrogène qu'il n'en faudrait pour faire de l'eau : ce sont deux substances *brunes*, l'*acide ulmique* $C^{40}H^{28}O^{12}$ soluble dans les alcalis, et l'*ulmine* $C^{40}H^{32}O^{14}$ insoluble dans ces réactifs. Dans les deux autres produits, l'oxygène est intervenu pour brûler cet excès d'hydrogène, et les substances renferment maintenant H et O dans les mêmes proportions que dans l'eau : ce sont des matières *noires*, l'*acide humique* $C^{40}H^{24}O^{12}$ soluble dans les alcalis, et l'*humine* $C^{40}H^{30}O^{15}$ insoluble dans ces réactifs ; l'ébullition prolongée avec les acides forts amène finalement l'acide humique à l'état d'humine.

On a cependant fait remarquer (STEIN, KRAUT) que les chiffres analytiques de MULDER concorderaient très suffisamment, pour toutes ces matières, avec l'hypothèse d'une *déshydratation pure et simple* des sucres ; voici par exemple des formules recalculées par KRAUT :

	C	H
Humine $C^{24}H^{18}O^9$	64,00 0/0	4,00 0/0
Ulmine $C^{24}H^{16}O^8$	66,56 »	3,71 »
Acide humique $C^{24}H^{14}O^7$. .	69,71 »	3,37 »

L'étude des matières brunes dérivant du saccharose par ébullition prolongée en présence d'acide sulfurique étendu a été reprise par Fausto SESTINI (1), qui confirme la distinction en *sacchulmine* insoluble dans la potasse et *acide sacchulmique* soluble dans ce réactif. Mais cet auteur refuse de considérer les produits ulmiques comme résultant d'une simple déshydratation du saccharose, car en même temps que l'eau s'élimine une quantité importante d'acides volatils, surtout d'acide formique ou d'une substance capable de lui donner naissance au contact de l'air. F. SESTINI considère toutefois comme erronées les formules de MULDER, parce que ce dernier, avant d'analyser les corps, les chauffait à 165°, ce qui provoque le dégagement d'une quantité considérable de substances volatiles et notamment d'acide formique. En évitant de dépasser

1. Fausto SESTINI. Sulle materie ulmiche che si ottengono dagli zuccheri per l'azione degli acidi (*Gazz. chim. ital.*, 10, 421, 1880). — Dell'acido sacculmico (*Gazz. chim. ital.*, 10, 240, 1880). — Della sacculmina (*Gazz. chim. ital.*, 10, 355, 1880).

100°, F. SESTINI trouve pour l'acide sacchulinique la formule $C^{44}H^{39}O^{16}$, et pour la sacchulmine $C^{44}H^{38}O^{15}$: il traduit la formation de la sacchulmine par l'équation :



Cependant M. CONRAD et M. GUTHZEIT (1) ont montré qu'il n'existe aucun rapport pondéral constant entre la production des matières humiques et celle de l'acide formique. Au contraire il existe un rapport constant entre l'acide formique et l'acide lévulique dont on connaît depuis B. TOLLENS la production, et que M. CONRAD (2) a reconnu être l'acide β -acétylpropionique. D'après M. CONRAD et M. GUTHZEIT, les deux acides prennent naissance suivant l'équation :



réaction contemporaine, mais tout à fait indépendante de celle qui produit les matières humiques *par simple déshydratation*. Les auteurs jugent d'ailleurs inutile de proposer une formule tant que la nature unitaire des produits n'est pas établie. Les divers sucres ne fournissent pas la même quantité de matières humiques : le lévulose en donne plus que le dextrose. HCl à 7-8 0/0 donne, à partir des divers sucres sauf le lévulose, plus de matières humiques que H^2SO^4 à 7-8 0/0. Plus sont concentrés les acides employés, plus grand est le rendement ; enfin les acides concentrés produisent des substances humiques plus riches en carbone que les acides étendus. M. CONRAD et M. GUTHZEIT ont vu osciller C entre 62,3 0/0 et 66,5 0/0, tandis que H variait entre 3,7 0/0 et 4,6 0/0.

Les travaux les plus larges sur les matières humiques sont ceux de F. HOPPE-SEYLER (3), tout au moins par l'extension que l'auteur accorde à la famille de substances qu'il étudie. Aux matières naturelles fournies par les terres arables, les terreaux, tourbes et lignites, F. HOPPE-SEYLER apparente en effet, non seulement les produits d'action des acides et des alcalis sur les sucres, mais aussi les *rouges de tannins* et les *phlobaphènes*. Les rouges de tannins, corps amorphes rouges ou brun foncé, résultent de l'altération des tannins pendant l'évaporation de leur solution aqueuse, surtout en présence d'un peu de H^2SO^4 ou de

1. M. CONRAD u. M. GUTHZEIT. Ueber die Entstehung und Zusammensetzung der Huminsubstanzen (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 19, 2844, 1886).

2. M. CONRAD. Ueber Acetopropionsäure und ihre Identität mit Levulin-säure (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 11, 2177, 1878).

3. F. HOPPE-SEYLER. Ueber Huminsubstanzen, ihre Entstehung und ihre Eigenschaften (*Z. physiol. Chem.*, 13, 66, 1888).

HCl. Les écorces des arbres contiennent fréquemment, sinon toujours, des substances très voisines, les phlobaphènes, insolubles dans l'eau et dans l'éther, mais solubles dans l'alcool. Toutes les substances énumérées, quelle que soit leur origine, ont pour caractère commun de fournir, par fusion avec un excès de potasse caustique à 245°, les mêmes produits : acides formique, acétique, oxalique, pyrocatechine et acide protocatéchique (1), acides *hymatomélaniques*. Sous ce nom particulier d'acides hymatomélaniques, F. HOPPE-SEYLER désigne des substances brunes, qui comme les acides humiques eux-mêmes, sont précipitées de leurs solutions alcalines par les acides, se gonflant dans l'eau qui n'en dissout qu'un peu, tout à fait insolubles dans l'éther, mais facilement solubles dans l'alcool. Cette fraction de la molécule humique qui résiste à la fusion potassique à 245° est très abondante, elle peut représenter environ 2/3 du total. Voici quelques analyses d'acides hymatomélaniques, provenant :

	C	H
De l'humine de saccharose {	65,45	4,69
	65,65	4,70
De l'acide humique de saccharose . . .	65,37	4,22
De l'humine d'ac. glycuronique. . . .	64,87	4,34
De l'ac. humique d'ac. glycuronique . . {	58,76	3,73
	58,83	3,54

D'un *lignite* F. HOPPE-SEYLER a retiré un acide humique auquel il attribue, négligeant la présence de l'azote (0,68 0/0), la formule $C^{26}H^{22}O^{10}$, et qui donne un acide hymatomélanique identique à celui des phlobaphènes et des substances humiques du saccharose.

L'auteur va même jusqu'à inclure dans le groupe des substances humiques les produits azotés bruns, solubles dans les alcalis et précipi-

1. La production de ces substances à partir des *sucres* eux-mêmes avait été déjà signalée. F. HOPPE-SEYLER lui-même avait remarqué (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 4, 346, 1871) que le glucose maintenu avec de la soude caustique au bain-marie (96°) fournit, non seulement de l'acide lactique et de l'acide formique, mais aussi un peu de pyrocatechine.

Dans une brève communication préliminaire, A. GAUTIER (*Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 31, 530, procès-verbal de la séance du 16 mai 1879) avait indiqué que « les produits dérivés du glucose par l'hydrate de baryte à 240° sont les acides acétique, formique, oxalique, la pyrocatechine et l'acide protocatéchique en faible proportion, en même temps qu'un acide sirupeux à sel de zinc cristallisable... ». A GAUTIER « rapproche par leurs produits de dédoublement sous l'influence des alcalis, les sucres, les catéchines et les tannins ».

tables par les acides, qu'on obtient en abandonnant avec un excès d'ammoniaque et en présence de l'air, des *corps phénoliques* comme l'acide protocatéchique et le pyrogallol. La fusion potassique en dégage tout l'azote sous forme d'ammoniaque, et il reste des acides hymatomélaniques (moins riches en carbone que ceux de l'humine).

La formule de F. HOPPE-SEYLER $C^{26}H^{22}O^{40}$ (acide humique du lignite) admet un peu plus d'hydrogène que l'hypothèse d'une déshydratation pure et simple.

La même opinion est celle de M. BERTHELOT et G. ANDRÉ (1), à qui l'on doit la remarquable découverte de la fixation des métaux alcalins et alcalino-terreux par les corps humiques artificiels dérivés du saccharose. De leurs recherches résulte que la distinction de MULDER, en humine insoluble et acide humique soluble dans la potasse, n'est nullement légitimée par une différence dans la constitution des corps, et n'est qu'une apparence due à la formation d'une série de sels de potassium d'un même corps, sels dont les uns sont solubles et les autres insolubles dans l'eau. Le produit d'action de HCl sur le saccharose, lorsqu'il a été longuement séché à 110° , consiste en un *anhydride humique* $C^{18}H^{14}O^6$. La fraction solubilisée par les alcalis, précipitée ensuite par HCl, desséchée rapidement et à température aussi basse que possible, est un *acide humique* $C^{18}H^{16}O^7$. A l'air l'acide humique perd un peu d'eau, tandis que l'anhydride en prend un peu : tous les échantillons ordinaires sont un mélange des deux corps, entre lesquels s'établit un équilibre.

« Les bases fixes déterminent l'hydratation complète de la portion
« d'anhydride mélangée avec l'acide lui-même. En même temps elles
« forment avec l'acide divers composés, suivant des proportions diffé-

« rentes et qui attestent le caractère polybasique de l'acide. Tels sont :

« 1^o Un sel monobasique, insoluble, et qui subsiste même après des
« lavages extrêmement prolongés à l'eau froide ;

« 2^o Un sel tribasique, insoluble, mais que l'eau décompose peu à

« peu à froid, et dont elle finit par extraire les deux tiers de l'alcali
« primitivement fixé ;

« 3^o Un sel plus basique encore, et qui se distingue parce qu'il est
« soluble.

« Ces phénomènes ont été observés surtout avec la potasse et la
« soude ; mais ils se manifestent aussi avec la baryte et la chaux » (2).

1. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Recherches sur les substances humiques (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 6^e s., 25, 364, 1892).

2. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. *Ann. de Chim. et Physiq.*, 6^e s., t. 25, p. 380.

Quant à l'ammoniaque, elle ne se contente pas de former des sels ammoniacaux : elle introduit dans la molécule organique de l'azote sous une forme résistante, dont il sera question plus loin.

Les analyses de M. BERTHELOT et G. ANDRÉ obligent à considérer comme authentiques les 2 atomes d'hydrogène surnuméraires qui figurent dans les formules : l'anhydride humique $C^{18}H^{14}O^6$ dériverait donc de 3 molécules de glucose $C^6H^{12}O^6$ par perte, non pas de 12 H^2O , mais seulement de (11 H^2O + O), le douzième atome d'oxygène étant enlevé par un autre phénomène contemporain de la déshydratation. L'humification du sucre ne consiste donc pas en une déshydratation pure et simple ; toutefois la déshydratation y joue bien un rôle, sinon exclusif, au moins prépondérant.

Mais quant à la constitution de la molécule brune sur laquelle viennent se fixer soit les métaux soit l'azote, nous ne savons rien. La fusion alcaline est un procédé trop brutal pour que la rencontre de l'acide protocatéchique parmi les produits puisse indiquer la préexistence d'un noyau aromatique : d'ailleurs nous avons vu que l'acide protocatéchique et la pyrocatechine se forment directement à partir du simple glucose. La réduction totale de la matière humique du saccharose ne fournit non plus aucun renseignement décisif : en maintenant cette matière à 275° avec 100 fois son poids d'acide iodhydrique, M. BERTHELOT (1) avait obtenu l'hydrocarbure $C^{12}H^{26}$ et un carbure oléagineux de la même série, presque fixe, $C^{24}H^{50}$ (?). Enfin le produit d'humification du glucose par HCl, mis en suspension dans la potasse étendue et additionné de brome, a récemment fourni à A. KONSCHEGG (2) une grande quantité de tétrabromure de carbone CBr_4 ; mais ici encore l'attaque de la molécule est trop profonde pour permettre une conclusion quelconque.

Les seuls produits dont on ait commencé l'étude sont donc ceux qui dérivent des sucres par l'action des *acides* : quant à ceux qui se forment par l'action des *alcalis*, ils ont été jusqu'ici laissés de côté, à l'exception des acides hymatomélaniques de F. HOPPE-SEYLER. L'attention des chercheurs a été attirée plutôt sur les produits plus simplifiés qui se forment alors, notamment l'acide lactique obtenu par F. HOPPE-SEYLER (3) dans l'attaque du glucose par la soude au bain-marie (96°).

1. M. BERTHELOT. Méthode universelle pour réduire et saturer d'hydrogène les composés organiques (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 4^e s., 20, 392, 1870). Voir p. 528.

2. A. KONSCHEGG. Ueber das Verhalten des Humus zur Bromlauge (*Z. physiol. Chem.*, 69, 390, 1910).

3. F. HOPPE-SEYLER. Ueber die Bildung von Milchsäure aus Zucker ohne Gährung (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 4, 346, 1871).

M. NENCKI et N. SIEBER (1) ont même vu, par simple séjour de 24 heures à l'étuve (35°-40°), le glucose, en présence de potasse étendue, brunir et donner de l'acide lactique en abondance (40 0/0), avec un autre acide : si je rappelle ici ces recherches, c'est que les auteurs ont obtenu la même transformation (qui échoue avec les carbonates alcalins et l'ammoniaque caustique) avec des *bases organiques* comme l'hydrate de tétraméthylammonium et la neurine, et qu'il n'est peut-être pas sans intérêt de comparer l'activité de ces bases organiques avec le pouvoir humificateur vraiment surprenant que j'ai découvert chez les acides aminés.

Examinons maintenant, comparativement aux matières brunes résultant de l'ébullition des sucres avec les sels minéraux, celles que j'ai obtenues par action du glyocolle sur le glucose. La formation de celles-ci s'est accompagnée d'un abondant dégagement d'eau, ainsi que je l'ai établi par un bilan, sans être d'ailleurs en mesure de me prononcer sur la présence ou le départ des 2 atomes d'hydrogène surnuméraires trouvés dans l'anhydride humique de M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Par rapport aux substances mises en jeu (1 molécule de glyocolle et 3 molécules au moins de glucose) cet hydrogène ne pèserait que $\frac{2}{75 + 3 \times 180} = \frac{1}{307,5}$, et la série des manipulations par lesquelles j'ai établi mon bilan n'a pas la prétention de dépasser une précision de 1 : 300. Mais le phénomène principal, la déshydratation intense, existe dans mes expériences.

De plus mon bilan m'a montré que pour chaque molécule de glyocolle combinée, s'échappaient 12 molécules H²O, c'est-à-dire précisément toute l'eau que pourraient fournir 2 molécules de glucose ramenées jusqu'à l'état de carbone pur. Comme la déshydratation n'est pas totale, ces 12 molécules H²O ont été empruntées à plus de 2 molécules C⁶H¹²O⁶ : la substance brune où se fixe l'azote doit donc représenter *au moins 3 molécules de glucose*. On a vu, de plus, que la matière résultant de l'action du glyocolle sur le glucose m'a fourni à l'analyse des chiffres conduisant à la formule C⁴⁶H¹⁵NO⁶, qui ne s'écarte pas beaucoup de cette conception. Ceci concorde avec les formules en C⁴⁸ que M. BERTHELOT et G. ANDRÉ attribuent à l'anhydride et à l'acide humiques.

La solubilité partielle dans les alcalis, la précipitation des solutions alcalines par les acides, sont d'autres ressemblances.

1. M. NENCKI u. N. SIEBER. Ueber die Zersetzung des Traubenzuckers und der Harnsäure durch Alkalien bei der Bruttemperatur (*Journ. f. prakt. Chem*, N. F., 24, 498, 1881).

Le seul point, point capital, par lequel mes substances diffèrent des produits de l'humification acide des sucres, c'est la présence de l'azote. Cet azote n'est point un accessoire, ajouté après coup par banale salification d'un acide exempt d'azote : j'ai établi qu'il fait partie intégrante de la molécule organique, d'où on ne peut le détacher par 10 heures d'ébullition dans l'acide sulfurique à 10 0/0. D'ailleurs le fait que le glycocolle n'introduit son azote dans la matière brune qu'au prix d'une dislocation de sa propre molécule (perte de CO²), montre bien qu'il s'agit d'un phénomène chimique important.

La fixation solide de l'azote dans la molécule organique condensée nous amène à nous reporter encore aux travaux de M. BERTHELOT et G. ANDRÉ sur l'anhydride humique dérivé du saccharose. « L'ammoniaque agit différemment des autres alcalis : elle produit avec l'anhydride humique un acide amidé spécial, ou pour mieux dire, les sels ammoniacaux de cet acide amidé. Une portion de l'azote ammoniacal passe ainsi à l'état de composé organique stable et insoluble, sous l'influence de l'acide humique » (1). Ainsi l'anhydride humique ayant séjourné à froid au contact d'un excès d'ammoniaque, bien lavé à l'eau puis séché à 40° dans un courant d'hydrogène, contient de l'azote sous deux formes. L'une est entraînée, sous forme d'ammoniaque, d'abord à 100° par un courant prolongé d'hydrogène (0,62 0/0 de la substance), puis par ébullition avec de l'eau et de la magnésie (0,76 0/0 de la substance). L'autre (1,31 0/0) n'est dégagée sous forme d'ammoniaque que par la chaux sodée au rouge. De même l'acide humique solubilisé par l'ammoniaque, précipité par les acides, lavé et séché à 100°, donne 1,53 0/0 d'azote solidement fixé. Les auteurs estiment que ces produits organiques azotés concordent suffisamment avec la formule :



qui comporte 1,4 0/0 d'azote (non déplaçable par la magnésie). La matière insoluble dans l'ammoniaque, après lavage à l'eau, contient en outre sous forme saline une quantité d'ammoniaque égale à la précédente et répond à la formule C⁵⁴H⁴⁷AzO⁴⁹, AzH³.

Chauffé à 100° en tube scellé avec un excès d'ammoniaque, l'acide humique fixe une plus grande quantité d'ammoniaque, soit environ 5 0/0 d'azote éliminable par simple dessiccation, 0,32 0/0 déplaçable par la magnésie à l'ébullition, et 3,54 0/0 d'azote résistant à la magnésie.

1. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Recherches sur les substances humiques (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 6^e s., 25, 364, 1892).

M. BERTHELOT et G. ANDRÉ (1) ont constaté encore que par contact à froid avec une solution de chlorure d'ammonium, l'anhydride humique déplace un peu d'acide chlorhydrique que l'on retrouve libre dans la liqueur, pendant que l'ammoniaque correspondante forme avec l'anhydride humique une combinaison organique azotée résistante. Les phosphates d'ammonium cèdent à l'anhydride humique une quantité encore plus grande d'azote, ainsi que du phosphore en proportion relativement plus faible.

Mes produits obtenus par réaction du glyocolle sur le glucose rappellent donc les composés organiques « amidés » de ces auteurs ; ils n'en diffèrent que par leur teneur en azote, qui est plus élevée. Mais il est très remarquable de constater que le produit le plus abondamment obtenu dans mes recherches avait une teneur de 4,35 0/0, dont le tiers 1,45 est précisément égal à la teneur 1,4 0/0 de l'acide « amidé » $C^{54}H^{47}AzO^{19}$ de mes prédécesseurs. Il est difficile de considérer comme fortuite une telle coïncidence ; il est plus plausible de penser que, tandis que dans les expériences de M. BERTHELOT et G. ANDRÉ la fixation *ultérieure* de l'azote sur un complexe humique antérieurement formé exigeait l'association de 3 molécules humiques en C^{48} pour la création d'une molécule azotée finale en C^{54} , dans mes expériences, où l'action de la molécule aminée est au contraire *la cause déterminante de l'humification*, chaque association C^{48} de 3 molécules de glucose reçoit d'emblée un atome d'azote, le produit final ayant une teneur triple.

D'ailleurs on a vu qu'en tube scellé à 100°, M. BERTHELOT et G. ANDRÉ obtenaient un produit à 3,54 0/0 d'azote stable. Moi-même, dans des fractions plus minimes suivant la fraction principale à 4,35 0/0, j'ai rencontré des teneurs croissantes de 4,86 0/0 et 5,48 0/0. Ceci s'expliquerait peut-être par l'enrichissement en glyocolle des liquides où naissaient ces fractions. Bien que j'aie employé, en effet, intentionnellement un excès de glucose par rapport à la quantité équimoléculaire qui serait 2,40 fois le poids du glyocolle (je prenais en glucose 4 fois le poids du glyocolle), il s'est trouvé que l'entrée en réaction simultanée de 3 molécules de glucose pour 1 molécule de glyocolle aurait exigé en glucose 7,20 fois le poids du glyocolle. En réalité l'acide aminé était donc en excès par rapport au sucre, et se concentrait dans les eaux-mères. Je me propose de reprendre les expériences en variant, sur une échelle très étendue, les proportions de sucre et d'acide.

1. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Sur le pouvoir absorbant de la terre et sur la fixation des sels ammoniacaux et des phosphates par l'acide humique (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 6^e s., 27, 196, 1892).

Relations avec les véritables matières humiques azotées.

— Vers le premier quart du XIX^e siècle, divers chimistes, DÖBEREINER, SPRENGEL, DU MÉNIL (1), extrayaient des terreaux et des tourbes un « acide de l'humus », un *acide humique* suivant l'expression de DÖBEREINER, qu'il était facile d'obtenir en faisant digérer dans l'ammoniaque la tourbe pulvérisée, et précipitant la solution par l'acide chlorhydrique. C'était l'époque où paraissaient les travaux sur l'ulmine qui ont été rappelés dans le paragraphe précédent, ceux de H. BRACONNOT notamment, et où l'on tendait à identifier les produits humiques et ulmiques, comme le fit P. BOULLAY en cataloguant comme *acide ulmique* la matière caractéristique de la tourbe.

Certains auteurs toutefois n'acceptaient pas cette identification, notamment BERZÉLIUS (2) qui préférait donner à la matière extraite par les alcalis des terreaux et des tourbes, le nom de *géine*. Il distinguait l'« extrait de terreau » soluble dans l'eau et de couleur jaune, qu'il rencontrait d'ailleurs dans un grand nombre d'eaux : « L'eau de la source de Porla, dans la Westrogothie, en contient une si grande quantité qu'elle en est colorée en jaune. Quand le fer contenu dans cette eau s'oxyde aux dépens de l'air, l'extrait de terreau se précipite avec l'oxyde ferrique, et l'eau se décolore » (3). Puis venait la « géine » qu'il ne considère pas comme un acide, à l'état naturel du moins : bien qu'il décrive toute une série de géates dérivés des alcalis, des alcalino-terreux, des métaux lourds, et admette l'existence d'un *acide géique*, il pense que celui-ci ne prend naissance que par action des alcalis sur la géine. Enfin reste le « terreau charbonneux », d'un brun presque noir, insoluble dans les liqueurs alcalines, que BERZÉLIUS ne décrit pas plus amplement, et qui, d'après les expériences de TH. de SAUSSURE, peut, par une longue exposition à l'air et à l'eau, devenir peu à peu soluble dans les alcalis.

Des substances du terreau BERZÉLIUS rapproche deux acides organiques qu'il a trouvés (4) dans plusieurs sources de Suède, notamment celle de Porla, où ces acides sont si abondants qu'ils colorent l'eau en jaune, et qui proviennent, d'après lui, de la décomposition des sub-

1. DU MÉNIL. *Journ. de Chim. médic.*, 1^{re} s., 2, 551, 1826.

2. J.-J. BERZÉLIUS. *Traité de Chimie* (trad. franç.), t. 5, p. 549, 1831 ; et t. 6, p. 573, 1832.

3. J.-J. BERZÉLIUS. *Traité de Chimie* (trad. franç.), t. 6, p. 572, 1832.

4. J.-J. BERZÉLIUS. Sur deux acides organiques qu'on trouve dans les eaux minérales (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 2^e s., 54, 219, 1833). — Découverte des acides chrénique et apochrénique dans les eaux minérales de Porla (*Journ. de Chim. médic.*, 1^{re} s., 10, 203, 1834).

stances végétales dans les grandes forêts marécageuses qui environnent la source. L'acide *crénique* et l'acide *apocrénique* se retrouvent, combinés au fer, dans les dépôts ocreux de la source. Bouillie avec la potasse, l'ocre donne un liquide brun d'où on précipite par l'acétate de cuivre, d'abord l'acide crénique en milieu acétique, puis l'acide apocrénique en milieu légèrement alcalinisé par Na^2CO^3 . L'acide crénique, jaunâtre, se transforme sous l'action de l'air en acide apocrénique, brun-noir. Ce qui fait pour nous l'intérêt de ces corps, c'est que BERZÉLIUS y signale expressément la présence de l'azote.

Cependant, et bien que certains auteurs, MULDER par exemple, aient retiré des terreaux des substances tout à fait comparables aux acides crénique et apocrénique, le caractère azoté des substances humiques ne paraît pas avoir attiré l'attention autant qu'il eût été désirable, et il faut arriver aux travaux de P. THÉNARD (1) pour voir proclamer de la façon la plus catégorique le rôle capital des substances azotées, en espèce l'ammoniaque, dans la formation des matériaux de l'humus. L'azote que l'on trouvait dans l'humus passait généralement pour être simplement à l'état de sel ammoniacal d'un acide humique non azoté lui-même ; aussi P. THÉNARD voulut-il, pour éviter toute erreur de ce genre, donner le nom nouveau d'*acide fumique* à la matière organique qu'il étudiait dans les fumiers, matière à la constitution de laquelle l'azote devait prendre une part essentielle, suivant une conception trop peu comprise au temps de P. THÉNARD et dont mes propres recherches viennent aujourd'hui montrer la parfaite légitimité. P. THÉNARD réussit à extraire l'acide fumique, non seulement des fumiers, mais aussi des terres arables, et le décrivit « comme étant une substance acide, peu azotée, très carbonée, médiocrement hydrogénée et oxygénée ». Nous examinerons tout à l'heure les idées de P. THÉNARD sur le mécanisme de formation des substances fumiques, idées que mes travaux actuels m'ont amené à retrouver, en les précisant.

Pour obtenir des documents précis sur les matières humiques naturelles contenues dans divers sols, il faut se reporter encore aux recherches approfondies de M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Dans l'échantillon de terre qu'ils ont étudié le plus minutieusement au point de vue de l'analyse complète des substances minérales et des substances orga-

1. P. THÉNARD. Mémoire sur la fixation des parties riches du fumier sur les terres (*C. R. Acad. Sc*, 44, 819, 1857). — Note sur la matière riche du fumier de ferme (*C. R. Acad. Sc.*, 44, 980, 1857). — Note sur une transformation de l'acide fumique par l'oxygénation (*C. R. Acad. Sc.*, 48, 722, 1859).

niques (1), ils ont trouvé que la matière organique possédait la composition globale que voici (2) :

C	56,1
H	4,4
Az	4,9
O	34,6
	100,0

Il s'agissait d'une terre à peu près saturée d'azote et n'ayant plus guère l'aptitude à fixer l'azote libre comme le font les terres moins riches. La teneur de la matière organique en azote est en effet variable : les auteurs ont trouvé des chiffres allant de 2,5 à 4,9 0/0 pour des terres argilo-siliceuses normales, de 3,1 à 4,9 0/0 pour des sables argileux, de 1,3 à 7,3 0/0 pour des kaolins naturels.

M. BERTHELOT et G. ANDRÉ avaient constaté (3) la solubilité partielle dans les alcalis de la matière humique du sol. En appliquant le fractionnement par les alcalis à l'échantillon de terre étudié plus haut, les auteurs ont déterminé quantitativement la répartition de la matière organique en trois groupes : 1^o principes insolubles à froid dans les alcalis ; 2^o principes solubles dans les alcalis, mais précipitables par les acides ; 3^o principes solubles dans les alcalis et non reprécipitables par les acides, c'est-à-dire engendrés nécessairement par dédoublement ou hydratation.

« Les seuls principes isolables, en suivant cette marche, sont les seconds, *solubles dans les alcalis, précipitables par les acides* ». Après purification, lavage, isolement et dessiccation à froid, ils offraient, défalcation faite de l'eau volatile à 110° et des cendres, la composition suivante :

C	55,2
H	6,8
Az.	3,0
O	35,0
	100,0

1. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Sur le dosage des matières minérales contenues dans la terre végétale et sur leur rôle en agriculture. Méthode d'analyse (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 6^e s., 25, 289, 1892).

2. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Sur les matières organiques constitutives du sol végétal (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 7^e s., 1, 273, 1894).

3. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Faits pour servir à l'histoire des principes azotés renfermés dans la terre végétale (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 6^e s., 25, 314, 1892).

« Cette composition répond à celle d'une matière amidée, qui résulterait de l'union de l'ammoniaque avec un hydrate de carbone moitié moins oxygéné que les glucoses : mais cette matière pourrait résulter du mélange de plusieurs principes immédiats distincts » (1).

Dans le même travail, M. BERTHELOT et G. ANDRÉ ont isolé la matière humique qui reste comme résidu insoluble lorsque tous les autres constituants de la terre sont éliminés par une longue série de lavages alternatifs aux acides fluorhydrique et chlorhydrique dans des vases de platine. Cette matière humique résiduelle, altérée déjà en partie par le traitement acide, présentait, pour deux échantillons de terres différents, la composition suivante :

	I	II
C	55,32	56,58
H	5,29	5,12
Az	4,24	3,04
O (avec un peu de S). .	35,15	35,26
	100,00	100,00

Ces matières insolubles ressemblent par leurs propriétés aux matières humiques artificielles qui se forment par l'action des acides sur le sucre : elles « enlèvent pareillement la potasse libre à ses solutions aqueuses étendues, et cela en formant deux ordres de composés : « les uns obtenus en présence d'un excès de potasse, et riches en « alcali ; les autres insolubles par des lavages à froid très prolongés et « qui en retiennent encore quelque dose ».

Fort de sa propre expérience, G. ANDRÉ, dans un excellent ouvrage tout récent (2), n'hésite pas à souligner, comme « un point capital « qu'il ne faut pas oublier de mentionner dans l'histoire de l'humus », ce fait que, « lorsqu'on dissout la matière organique du sol dans un « alcali et qu'on reprécipite la solution brune par un acide, les flocons « ainsi obtenus renferment toujours de l'azote ». Cet azote « est fixé « d'une manière si énergique au noyau carboné que, si l'on fait bouil- « lir de l'humus avec une solution de soude ou de potasse, il ne « s'éliminera qu'une partie de cet azote à l'état d'ammoniaque ; le reste « demeure combiné à la molécule carbonée d'où il ne se dégagerait « qu'à la suite d'un traitement très prolongé ».

1. M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Sur les matières organiques constitutives du sol végétal (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 7^e s., 1, 273, 1894).

2. G. ANDRÉ. *Chimie agricole. Chimie du sol*. Paris, J.-B. Baillière, 1913.

Outre ses propres recherches, G. ANDRÉ rappelle les analyses d'EGGERTZ (1889), qui sur 13 précipités obtenus en traitant des solutions alcalines d'humus par un acide minéral, a trouvé des chiffres d'azote compris entre 2,6 et 6,4 0/0.

De l'avis même des auteurs les plus compétents et les plus modernes, on commettrait donc une grave erreur en considérant l'azote comme *accessoire* dans les matières humiques naturelles. Me basant à mon tour sur ma synthèse des matières humiques par les acides aminés et les polypeptides, je me suis permis plus haut de dire qu'il serait peut-être téméraire de vouloir maintenir une assimilation trop étroite entre les vraies matières humiques naturelles et les matières non azotées dites « humiques » obtenues par l'action des acides sur les sucres.

Les chimistes agronomes ont établi avant moi que l'azote se rencontre toujours dans les produits de l'humification naturelle ; pour ma part, je vais plus loin, et *je crois pouvoir affirmer que l'azote joue un rôle nécessaire et déterminant dans les processus naturels de l'humification.*

Mes recherches me ramènent ainsi à une opinion voisine de celle qu'avait proclamée P. THÉNARD il y a un demi-siècle, et qui n'avait pas été suffisamment comprise. P. THÉNARD commence par observer avec soin les diverses circonstances dans lesquelles on voit se former, dans la nature, des substances « fumiques » (1).

« Maintenant, dit-il, en pesant avec soin toutes ces observations, la « seule conclusion logique à laquelle on pouvait arriver était que « l'acide fumique ne dérive pas de la matière animale, mais d'une « réaction de la matière animale sur le ligneux ou sur les parties « extractibles de la paille, des feuilles ou de la sciure de bois. Or en « réfléchissant que les matières animales ne peuvent exister longtemps « dans les conditions que nous avons indiquées sans se décomposer et « donner de l'ammoniaque comme produit azoté principal de leur « décomposition ; que de plus le ligneux change tout à fait d'aspect et « de propriétés physiques en devenant fumier, on était amené à croire « que l'acide fumique est le résultat de la combinaison de l'ammoniaque « ou de certains sels ammoniacaux avec certains éléments de la paille, « qu'ils soient ligneux ou extractibles, tandis que les éléments complémentaires se brûlent ou s'évaporent. Par conséquent en arrosant de « la paille, des feuilles, de la sciure de bois avec une dissolution « d'ammoniaque pure et étendue, ou avec certains sels ammoniacaux

1. P. THÉNARD. Considérations sur la formation de certaines matières azotées et particulièrement de l'acide fumique (*C. R. Acad. Sc.*, 52, 444, 1861). — Mémoire sur la fixation de l'azote dans les corps organiques neutres (*Bull. Soc. chim. Paris*, 1861, 33).

« bien choisis, on devait obtenir de l'acide fumique. L'expérience était
« simple : elle fut faite immédiatement et réussit complètement avec
« l'ammoniaque, le carbonate et le sulfate d'ammoniaque » (1).

Passant à l'expérimentation sur des substances définies, P. THÉNARD découvrit que l'ammoniaque réagit avec une grande facilité sur les sucres pour former des matières azotées noirâtres (2).

« Quand dans du glucose fondu dans son eau de cristallisation et
« porté à une température qui peut être de moins de 100°, on fait passer
« un courant d'ammoniaque, le gaz s'absorbe avec la plus grande
« rapidité et il distille non seulement de l'eau de fusion, mais encore
« plus d'eau de composition, pendant qu'en même temps il se forme
« des substances multiples et brunes, qui dosent pour le moins 10 0.0
« d'azote. »

« Quand dans des tubes fermés on traite à des températures diverses,
« par l'ammoniaque liquide, du glucose, du sucre, de la mannite, du
« ligneux, de l'amidon, du tartrate d'ammoniaque, on obtient des pro-
« duits qui, sans être identiques dans leur composition, sont de la
« famille fumique; de plus, dans toutes ces réactions, il y a production
« de carbonate d'ammoniaque, et par conséquent décomposition et
« oxydation de la matière organique ».

« Trois de ces substances ont été étudiées avec un certain soin. La
« première, dérivée du glucose, est d'un brun clair, soluble dans
« l'eau, les acides et les dissolutions alcalines, mais insoluble dans
« l'alcool ».

« La deuxième, dérivée du sucre de canne, a des tendances très
« marquées à l'alcalinité, car tous les acides, même l'acide carbonique,
« la dissolvent avec facilité, et tous les alcalis la précipitent; elle est
« brune, incristallisable, soluble dans l'alcool et insoluble dans l'eau ».

« La troisième, qui vient également du sucre, se produit en même
« temps que la précédente, et en partage les propriétés principales,
« sauf qu'elle est moins azotée et insoluble dans l'alcool ».

« ... Voici du reste l'analyse de ces trois substances » (3) :

1. P. THÉNARD. *Bull. Soc. chim. Paris*, 1861, p. 38.

2. P. THÉNARD. Considérations sur la formation de certaines matières azotées et particulièrement de l'acide fumique (*C. R. Acad. Sc.*, 52, 444, 1861). — Mémoire sur la fixation de l'azote dans les corps organiques neutres (*Bull. Soc. chim. Paris*, 1861, 33). — Action de l'ammoniaque sur les matières organiques ternaires neutres (Suite) (*Bull. Soc. chim. Paris*, 1861, 60).

3. P. THÉNARD. *C. R. Acad. Sc.*, t. 52, p. 446, 1861.

	N° 1	N° 2	N° 3
Carbone	52,28	65,66	54,26
Hydrogène	6,38	6,05	5,34
Azote	9,94	19,36	18,78
Oxygène	31,40	8,93	21,61

Enfin P. THÉNARD (1) constata encore :

« Que, tandis que le sucre et l'ammoniaque ne réagissent pas l'un sur l'autre à une température moindre de 140°, le phosphate d'ammoniaque neutre et même basique a, dès 80°, une action des plus vives, car outre de l'acide carbonique, il se produit dans son contact avec le sucre des substances carbo-azotées de la série fumique et peut-être des substances phospho-fumiques ;

« Que la glycose et certaines parties extractibles des végétaux, cependant si sensibles à l'action de l'ammoniaque, le sont bien plus encore à celle du phosphate d'ammoniaque ; que le ligneux et le sucre de lait, qui ne sont attaqués par l'ammoniaque qu'à des températures très élevées, le sont à de bien moindres par le phosphate d'ammoniaque et donnent des produits analogues à ceux qu'on obtient avec le sucre. »

A la même époque et dans des recherches indépendantes, P. SCHUTZENBERGER (2) observait « qu'un grand nombre de corps organiques peuvent fixer de l'azote sous une autre forme qu'à l'état de sel ammoniacal, lorsqu'on les chauffe pendant un temps plus ou moins long en présence d'une solution concentrée et aqueuse d'ammoniaque à l'abri de l'air, et à des températures comprises entre 100 et 200° ». Son « attention s'est plus particulièrement portée sur les substances hydrocarbonées neutres (sucres, amidon, dextrine, gomme, cellulose). Ces différents corps, chauffés avec de l'ammoniaque caustique à 150° pendant plusieurs jours, ont tous fixé de l'azote. En évaporant les produits de la réaction à sec, on obtient des masses solides légèrement brunes, que le charbon animal décolore facilement, très solubles dans l'eau et même légèrement déliquescentes, solubles dans l'alcool, de saveur amère ; leur solution précipite quelquefois abondamment par le tannin ; chauffées à sec, elles répandent une odeur très sensible de viande rôtie. »

1. P. THÉNARD. Note sur l'action réciproque des phosphates, de l'ammoniaque et de divers corps neutres organiques les uns sur les autres (*C. R. Acad. Sc.*, 53, 1019, 1861).

2. P. SCHUTZENBERGER. De l'action de l'ammoniaque caustique sur certaines matières organiques (*Bull. Soc. chim. Paris*, 1861, 16).

Il s'éleva même alors un débat de priorité entre les deux savants (1), débat qui fut tranché en faveur de P. THÉNARD (2). Nous pouvons remarquer d'ailleurs que les substances azotées de P. SCHUTZENBERGER, incolores, très solubles dans l'eau et même déliquescentes, ne sauraient être comparées aux matériaux de l'humus, et ce qu'il faut en retenir surtout pour le sujet qui nous occupe, c'est que l'action de l'ammoniaque sur les sucres peut fournir autre chose que des matières humiques.

On connaît d'autre part la série des dérivés azotés de sucres que C. A. LOBRY DE BRUYN et F. H. VAN LEENT (3) ont obtenus en abandonnant pendant plusieurs jours les sucres au contact de l'alcool méthylique saturé de gaz ammoniac. Les composés $C^5H^{14}O^4N$ fournis respectivement par l'arabinose et le xylose diffèrent des sucres eux-mêmes par fixation de NH^3 et perte de OH . Le glucose donne une glucosamine $C^6H^{13}O^5N$ dont les relations avec le sucre générateur sont du même ordre, ainsi que celles qui relient au galactose la galactosamine $C^6H^{13}O^5N$ formée en présence d'un peu d'eau; en l'absence de l'eau ce même galactose donne le corps $C^6H^{10}O^5, 2NH^3$. Du fructose dérive, par le traitement ammoniacal méthylique, une substance $C^6H^9O^4N$; du mannose provient un corps $C^{12}H^{23}O^{16}N$; du maltose dérive le composé $C^{12}H^{22}O^{11}, NH^3$.

Il est certain enfin, que l'action de l'ammoniaque sur les sucres peut fournir des alcaloïdes cycliques, se rattachant à la pyrazine. Dès 1885, C. TANRET (4), chauffant à 100° en tube scellé, pendant 30-40 heures,

1. P. SCHUTZENBERGER. Action de l'ammoniaque caustique sur les substances organiques; réclamation de priorité adressée à l'occasion d'une communication récente (Extrait) (*C. R. Acad. Sc.*, 52, 641, 1861). — P. THÉNARD. Sur la question relative au mode de formation de certaines matières azotées. Réponse à une réclamation de priorité (*C. R. Acad. Sc.*, 52, 702, 1861).

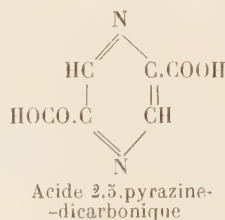
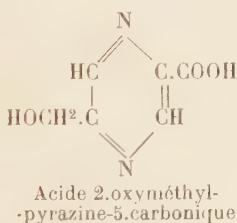
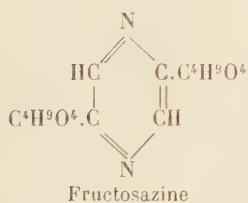
2. Mention de la première communication de P. THÉNARD figure en effet, à la date du 13 avril 1860, dans les procès-verbaux de la jeune Société chimique de Paris (Voir *Bull. Soc. chim. Paris*, 1861, p. 18, en note). La prise de date de P. SCHUTZENBERGER est mentionnée seulement à la date du 10 décembre 1860 (*C. R. Acad. Sc.*, t. 51, p. 946).

3. C. A. LOBRY DE BRUYN. Dérivé ammoniacal de la d-glucose (*Rec. trav. chim. Pays-Bas*, 14, 98, 1895). — C. A. LOBRY DE BRUYN et F. H. VAN LEENT. Dérivés ammoniacaux de quelques sucres (lactose, maltose, galactose, xylose, arabinose, mannose) (*Rec. trav. chim. Pays-Bas*, 14, 134, 1895). — C. A. LOBRY DE BRUYN et F. H. VAN LEENT. Dérivés ammoniacaux de la mannose, de la sorbose et de la galactose (*Rec. trav. chim. Pays-Bas*, 15, 81, 1896). — C. A. LOBRY DE BRUYN. Un dérivé ammoniacal du fructose (*Rec. trav. chim. Pays-Bas*, 18, 72, 1899).

4. C. TANRET. Alcaloïdes produits par l'action de l'ammoniaque sur le glucose (*C. R. Acad. Sc.*, 100, 1540, 1885; et *Bull. Soc. chim.*, 2^e s., 44, 102, 1885).

un mélange de 60 parties de glucose et 100 parties d'ammoniaque à 25°B., trouve dans le sirop noirâtre, à côté de la substance de P. THÉNARD, jusqu'à 1,5 0/0 d'alcaloïdes, qu'il extrait par le chloroforme. C. TANRET a isolé deux termes liquides, la *glucosine-α* $C^6H^8N^2$ qui bout à 136°, et la *glucosine-β* $C^7H^{10}N^2$ qui bout à 160°. La composition même de ces substances a été contestée par P. BRANDES et C. STÖHR (1), qui des produits de chauffage du glucose avec l'ammoniaque ont retiré la pyridine, la *pyrazine*, la *2-méthylpyrazine*, et la *2.6-diméthylpyrazine*. C. TANRET (2) a fait observer fort judicieusement que les résultats de P. BRANDES et C. STÖHR ne sauraient en aucune façon porter atteinte aux siens, qui concernent une partie du fractionnement des produits. Il est néanmoins intéressant de remarquer que les formules mêmes établies par C. TANRET répondent à des bases pyraziques : la *glucosine-α* $C^6H^8N^2$ a la composition d'une diméthylpyrazine $C^4H^2(CH^3)^2N^2$, et la *glucosine-β* $C^7H^{10}N^2$ a la composition d'une triméthylpyrazine $C^4H(CH^3)^3N^2$.

A son tour K. STOLTE (3) a établi que la substance résultant de l'action de l'ammoniaque sur le fructose, ou se formant aussi par altération de la glucosamine, et à laquelle C. A. LOBRY DE BRUYN donnait la formule $C^6H^9O^4N$, doit avoir sa formule doublée, et n'est pas autre chose qu'une *2.5-ditétraoxybutylpyrazine* qu'il nomme *fructosazine*. Administrée aux animaux (4), la fructosazine est éliminée en partie sous forme d'*acide 2.oxyméthylpyrazine-5.carbonique*, en partie sous forme d'*acide 2.5.pyrazinedicarbonique*, en partie détruite par décomposition plus avancée.



1. C. STÖHR. Ueber Pyrazine und Piperazine. VI Abh. P. BRANDES u. C. STÖHR. Ueber die Bildung von Pyrazin und Homologen aus Traubenzucker und Ammoniak (*Journ. f. prakt. Chem.*, N. F., 54, 481, 1896).

2. C. TANRET. Sur les glucosines (*Bull. Soc. chim.*, 3^e s., 17, 801, 1897).

3. K. STOLTE. Ueber das Verhalten des Glykosamins und seines nächsten Umwandlungsproduktes im Tierkörper (*Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 11, 19, 1908).

4. K. STOLTE. Ueber das Verhalten des Glykosamins und seines nächsten Umwandlungsproduktes im Tierkörper (*Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*,

Or, K. SPIRO (1) a pu constater chez plusieurs lapins qu'une injection simultanée de *glycocolle* (2 gr.) et de *fructose* (5 gr.) dans les veines faisait apparaître en certains cas, dans l'urine, l'*acide 2.5.pyrazinedicarbonique*. L'organisme a donc le pouvoir de synthétiser le noyau pyrazique à partir des sucres et des acides aminés, ce qui vient corroborer la trouvaille antérieurement faite (H. SCHRÖTTER (2), E. C. MORIN (3), dans les produits de fermentation des sucres par la levure, de bases (bases du fusel) que leur composition caractérise comme des pyrazines méthylées.

Tout ceci prouve évidemment que l'union de l'ammoniaque et des sucres peut donner autre chose que des substances humiques, suivant les circonstances. Mais il semble bien cependant que les produits noirâtres de P. THÉNARD aient quelque analogie avec les matières humiques. Quoi qu'il en soit, il est un fait incontestable, c'est que rien, ni dans la composition, ni dans les propriétés, ne permet de distinguer les produits obtenus par moi-même dans l'action des acides aminés sur les sucres, des véritables matériaux de l'humus extraits par M. BERTHELOT et G. ANDRÉ. Je ne pense pas non plus qu'on puisse les distinguer des matières noirâtres qui prennent naissance dans la fabrication des *fumiers* : par exemple P. P. DEHÉRAIN (4), en épuisant du fumier par l'eau chaude, et précipitant par HCl le liquide alcalin très coloré, obtient des produits qui, après défalcation des cendres, ont la composition suivante :

	Echant. I	Echant. II
Carbone	59,4	59,2
Hydrogène	5,4	5,2
Azote	4,7	4,3
Oxygène	30,5	31,3

D'autres modes d'extraction lui ont donné des produits de composition :

11, 49, 1908). — Ueber den Abbau des Fructosazins (Ditetraoxybutylpyrazins) im Tierkörper (*Biochem. Zeitschr.*, 12, 499, 1908).

1. K. SPIRO. Zur Lehre vom Kohlehydratstoffwechsel (*Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 10, 277, 1907).

2. H. SCHRÖTTER. Ueber eine im Fuselöl enthaltene Base (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 12, 1431, 1879).

3. E. C. MORIN. Sur les bases extraites des liquides ayant subi la fermentation alcoolique (*C. R. Acad. Sc.*, 106, 360, 1888).

4. P. P. DEHÉRAIN. *Traité de Chimie agricole*, 2^e édit, Paris, 1902. Voir p 791.

Carbone	57,7	63,0
Hydrogène	6,1	5,8
Azote	3,3	3,0
Oxygène	32,9	28,2

Malgré les petites variations centésimales, il est évident que tous ces produits sont de la même famille que les miens.

Je ne saurais donc en aucune façon partager le scepticisme avec lequel P. P. DEHÉRAIN accueille les idées de P. THÉNARD sur la naissance des matières humiques par combinaison de l'ammoniaque aux sucres. Voici en quels termes il manifeste ce scepticisme : « Le baron « P. THÉNARD avait combiné, à 100°, du glucose à de l'ammoniaque, il « avait obtenu une matière qu'il avait désignée sous le nom de glucose « azoté, qui lui paraissait avoir une grande importance dans la « fabrication du fumier, mais le glucose est en si faible quantité dans « la paille que cette réaction ne paraît pas se produire dans le fumier « en place » (1).

Et cependant, à la page même où il formule cette réserve, P. P. DEHÉRAIN cite des travaux de A. HÉBERT qui auraient pu lui donner la clé du problème. S'il est vrai que la paille fraîche ne contient que des quantités insignifiantes de glucose libre, elle contient en abondance, non seulement des substances génératrices de glucose comme la cellulose, mais aussi de la gomme de paille dont A. HÉBERT (2) a signalé la présence peu de temps après la découverte de la gomme de bois par H. J. WHEELER et B. TOLLENS (3), et qui fournit par sa décomposition hydrolytique une grande quantité de xylose. Or cette gomme de paille est, avec la cellulose, l'une des substances qui sont attaquées le plus énergiquement lors de la fermentation de la paille ensemencée en milieu alcalin par les bactéries du purin (A. HÉBERT (4), et cette active décomposition microbienne des hydrates de carbone, sur laquelle insiste P. P. DEHÉRAIN lui-même (5), peut être une source abondante,

1. P. P. DEHÉRAIN. *Traité de Chimie agricole*, 2^e édit., Paris, 1902. Voir p. 789, en note.

2. A. HÉBERT. Sur une nouvelle méthode d'analyse de la paille (*C. R. Acad. Sc.*, 110, 969, 1890). — Etude de la paille. Nouvelle méthode d'analyse (*Annales agronomiques*, 16, 358, 1890).

3. H. J. WHEELER et B. TOLLENS. Ueber die Xylose (Holzzucker) und das Holzgummi (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 22, 1046, 1889).

4. A. HÉBERT. Etude sur la préparation du fumier (*Annales agronomiques*, 18, 536, 1892).

5. P. P. DEHÉRAIN. *Traité de Chimie agricole*, 2^e édit., Paris, 1902. Voir p. 788.

non seulement de glucose, mais aussi de xylose. Pour moi qui ai constaté l'extraordinaire facilité avec laquelle le xylose, en présence des acides aminés ou des polypeptides, donne des matières brunes analogues à celles du purin, je ne puis douter de la formation des matières humiques du fumier par réaction des sucres et notamment du xylose, soit avec l'ammoniaque provenant de la fermentation de l'urée, soit avec les aminoacides ou les polypeptides provenant de la désagrégation des protéiques animaux ou végétaux présents dans les fumiers.

Cette interprétation est d'autant plus plausible que P. P. DEHÉRAIN, JOULIE, A. HÉBERT (1) ont vu, au cours de la maturation des fumiers, l'azote ammoniacal diminuer tandis qu'augmentait l'azote en combinaison organique. P. P. DEHÉRAIN (2) pensait, il est vrai, que ces combinaisons organiques azotées de formation nouvelle n'étaient pas autre chose que celles qui constituent la matière vivante même des microorganismes en voie de pullulation ; mais il me semble beaucoup plus vraisemblable d'y reconnaître, pour une part importante au moins, le produit de la réaction purement chimique, et non microbienne, des sucres avec les corps aminés.

Dans mes conceptions personnelles (3), les microorganismes peuvent donc bien intervenir dans la genèse naturelle des matières humiques, mais seulement à titre préparatoire, lors de la décomposition des polysaccharides en sucres réducteurs et des protéiques en acides aminés ou en polypeptides relativement simples. Mais, passée cette période préparatoire, où même de simples phénomènes d'autolyse pourraient peut-être en certains cas suppléer toute intervention microbienne, *la formation des matières humiques consiste en une réaction chimique automatique, où les microorganismes n'ont à intervenir en aucune façon.*

De même que la formation des matières humiques est un phénomène *aseptique*, de même elle est aussi un phénomène *anaérobie*, auquel l'oxydation ne prend aucune part essentielle. Sans doute je n'entends pas contester que lors de la régression des débris organisés dans le sol ou à sa surface, une partie de la matière organique soit éliminée par oxydation ; mais la partie qui demeure et forme les matières humiques est

1. A. HÉBERT. Etude sur la préparation du fumier (*Annales agronomiques*, 18, 536, 1892).

2. P. P. DEHÉRAIN. *Traité de Chimie agricole*, 2^e édit., Paris, 1902. Voir p. 789.

3. L. C. MAILLARD. Formation d'humus et de combustibles minéraux sans intervention de l'oxygène atmosphérique, des microorganismes, des hautes températures, ou des fortes pressions (*C. R. Acad. Sc.*, 155, 1554, 1912).

précisément celle qui a échappé à l'oxydation, bien loin de lui devoir en quoi que ce soit sa naissance.

Ma théorie de la genèse des matières humiques permet encore de se rendre compte de diverses particularités observées dans l'étude des sols, par exemple de certains dégagements, en apparence paradoxaux, d'anhydride carbonique. Ainsi P. P. DEHÉRAIN et DEMOUSSY ont vu les terres, portées à des températures croissantes, dégager des quantités de CO_2 de plus en plus considérables, surtout vers 90° - 100° . Jusque-là, les quantités de CO_2 extraites des tubes d'expérience ne surpassaient pas la quantité d'oxygène préexistant dans ces tubes, ce qui permettait d'attribuer à un phénomène d'oxydation la naissance de CO_2 . Mais « l'attaque à des températures supérieures à 100° présente cette particularité que l'acide carbonique produit surpasse de beaucoup l'oxygène préexistant ; dans ces conditions la matière organique se décompose de façon à émettre de l'acide carbonique dont elle fournit les deux éléments » (1).

Or j'ai établi que la formation des matières humiques aux dépens des aminoacides s'accompagne toujours d'un dégagement *anaérobie* de CO_2 , dont les deux éléments sont empruntés à la molécule organique, et qui représente le carboxyle rompu de l'acide amino. L'anhydride carbonique de DEHÉRAIN et DEMOUSSY ne représenterait-il pas de semblables carboxyles rompus, et ne pourrait-il provenir, en particulier, d'acides aminés ou de polypeptides achevant de se transformer en matières humiques ?

Enfin j'ai montré qu'une molécule d'acide amino prenant part à la formation des matières humiques est définitivement détruite, précisément à cause de la rupture du carboxyle, et qu'on ne peut, naturellement, la régénérer par hydrolyse de la matière humique. Mais j'ai montré aussi que des polypeptides peuvent, à la façon des aminoacides libres, se fixer eux aussi sur les sucres et former des matières humiques. Ces matières humiques peuvent être, constatons-le en passant, spécialement riches en azote, leur molécule renfermant plusieurs atomes de cet élément. Or, il est évident que l'hydrolyse totale d'une telle molécule ne peut régénérer l'acide amino qui formait l'extrémité de la chaîne polypeptidique et dont le carboxyle est détruit ; mais elle pourrait régénérer les chaînons intermédiaires.

La matière organique des sols pourrait donc en ce cas, par hydrolyse totale, fournir des acides aminés. Or, il est intéressant de noter que dans

1. P. P. DEHÉRAIN. *Traité de Chimie agricole*, 2^e édit., Paris, 1902. Voir p. 473.

ces derniers temps, des chimistes américains, S. L. JODIDI (1), Ch. S. ROBINSON (2), en soumettant la tourbe des terrains du Michigan à des épuisements prolongés par HCl ou par H²SO⁴ à 23 0/0, ont pu trouver dans les liquides d'épuisement toute une série d'acides monoaminés (leucine, isoleucine, histidine, acide aspartique) et d'acides diaminés (lysine, arginine). Dans l'opinion des auteurs eux-mêmes, ces amino-acides pourraient bien être contenus dans les tourbes à l'état de combinaison plutôt qu'à l'état libre ; et nous pouvons alors nous demander s'ils ne feraient pas partie précisément de la molécule même des matières humiques, molécule où ils seraient entrés par le mécanisme que je viens d'exposer.

Relations avec les combustibles minéraux. — Tout près des matériaux naturels de l'humus, il faut placer les *combustibles minéraux*, qui n'en diffèrent que par les circonstances qui ont permis l'accumulation et la conservation des débris en grandes masses, et dont les diverses variétés se relient les unes aux autres par toute une série de transitions.

Les combustibles minéraux comprennent classiquement : la *tourbe* ; le *lignite*, charbon compact, terreux, ligneux ou fibreux, contenant 55-75 0/0 de carbone, et riche en substances bitumineuses ; la *houille*, à cassure brillante, à teneur en carbone de 75-90 0/0 ; l'*anthracite*, charbon sec, à éclat métallique, dont la richesse en carbone dépasse 90 0/0. Il faut y joindre le *boghead*, provenant de la fossilisation des algues d'eau douce, et le *cannel-coal*, qui paraît constitué essentiellement par des spores de Cryptogames.

La relation de ces produits avec les matières humiques est incontestable. La tourbe a servi à de nombreux auteurs, depuis les plus anciens jusqu'aux plus récents (Sven ODÉN (3), de matière première pour l'extraction des acides humiques. Les lignites sont caractérisés par la propriété de fournir, quand on les fait bouillir avec la potasse, une solution colorée en brun ; parmi les nombreuses substances humiques étudiées par F. HOPPE-SEYLER (4) figure un acide humique extrait

1. S. L. JODIDI. Organic nitrogen-compounds in the bog soils (*Journ. Amer. chem. Soc.*, 32, 396, 1910). — Chemical nature of organic nitrogen in the soil (*Journ. Amer. chem. Soc.*, 33, 1226, 1911). — The chemical nature of the organic nitrogen in the soil (*Journ. Amer. chem. Soc.*, 34, 94, 1912).

2. Ch. S. ROBINSON. Two products isolated from the bog soils (*Journ. Amer. chem. Soc.*, 33, 564, 1911).

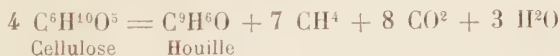
3. Sven ODÉN. Zur Kenntniss der Humussaure des Sphagnum-Torfes (*Ber. d. d. chem. Ges.*, 45, 651, 1912).

4. F. HOPPE-SEYLER. Ueber Huminsubstanzen, ihre Entstehung und ihre Eigenschaften (*Z. physiol. Chem.*, 13, 66, 1888).

d'un lignite de Saxe, qui offrait la composition $C = 63,31$ 0/0, $H = 4,35$ 0/0, $N = 0,68$ 0/0, et fournissait par fusion potassique un acide hymatomélanique. Quant aux houilles, si elles ne cèdent plus rien aux alcalis bouillants, en revanche leur traitement à chaud par l'acide nitrique additionné de chlorate de potassium fournit des liquides bruns très riches en matière dissoute.

Mon intention n'est point d'intervenir dans les controverses géologiques relatives aux circonstances mécaniques de la formation des dépôts houillers : je n'ai nullement la prétention de départager les partisans de l'autochtonie ou de l'allochtonie des gisements. Je voudrais seulement indiquer que la réaction générale des acides aminés sur les sucres, signalée par moi dans les chapitres précédents, pourrait être de quelque utilité aux géologues pour interpréter les transformations chimiques qu'a subies la matière des dépôts houillers.

Mon but est avant tout d'insister sur le rôle des corps azotés, qui paraît avoir été jusqu'ici unanimement ignoré ou rejeté. En général, les traités de Géologie indiquent bien la présence, dans les combustibles minéraux, d'une petite quantité d'azote ; mais ils ne signalent cet élément, à côté des cendres, qu'à titre tout accessoire, en tant que petit fait d'analyse, et comme par acquit de conscience, sans se demander si cet azote n'aurait pas joué un rôle important dans la constitution même de la matière organique fossilisée. C'est ainsi que l'équation globale par laquelle B. RENAULT (1) exprime la formation de la houille, ne tient compte que de la cellulose seule :



De même, c'est encore à partir de la cellulose seule que B. RENAULT envisage la formation des bogheads :



Si certains auteurs ont moins schématisé, et fait entrer en compte, outre la cellulose, d'autres constituants des tissus végétaux, il ne semble pas que les corps azotés aient eu cette bonne fortune. C'est ainsi que dans un article tout récent, V. B. LEWES (2), pour expliquer la

1. B. RENAULT. Les bactéries fossiles et leur œuvre géologique (*Rev. gén. d. Sc.*, 7, 804, 1896). — Sur quelques microorganismes des combustibles fossiles (*Bull. Soc. Industrie minière*, 3^e s., 13, 1899 ; 14, 1890).

2. V. B. LEWES. La carbonisation de la houille. Composition de la houille. (*Monit. Scientif. Quesneville*, 5^e s., 3, 45, 1913 ; traduit de *Journ. Roy. Soc. of Arts*, 60, 135, 1912).

formation de la houille, fait appel, non seulement à la cellulose, mais aussi à la vasculose et aux produits résineux ; mais il écarte formellement de ses préoccupations les substances minérales et les composés azotés :

« Notre connaissance des constituants entrant dans la multitude des transformations produites durant la formation de la houille est limitée à celle du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène, mais il est peu probable que les constituants minéraux de la sève et de la fibre aient joué un rôle important durant ces actions de transformation... Il en est de même des composés azotés qui se trouvent dans tous les combustibles d'origine végétale. Aussi est-il préférable, dans l'étude des transformations subies aux différentes époques de la formation, de laisser de côté un corps dont le rôle ne peut être que mal défini, pour ne considérer que les variations des éléments carbone, hydrogène et oxygène contenus dans les matériaux ».

Pendant, lorsqu'on a comme moi vu les sucres, dans des conditions où à l'état pur ils restent indéfiniment inaltérés, fournir en quelques instants, lorsqu'on y ajoute un peu d'un aminoacide, des matières brunes du groupe humique, il n'est plus possible d'admettre que le rôle des corps azotés soit aussi insignifiant et aussi « mal défini » qu'on l'écrit encore à l'heure actuelle.

Même au point de vue quantitatif, l'azote des combustibles minéraux ne peut être considéré comme insignifiant. Pour ne pas multiplier inutilement les données numériques, je me contenterai d'emprunter quelques chiffres à un ouvrage connu de R. WAGNER et F. FISCHER (1). Pour les *tourbes*, nous y trouvons (t. I, p. 26) dix analyses où l'azote varie de 0,77 0/0 (Tourbe du Harz, d'après WEBSKY) à 2,62 0/0 (Tourbe de Bade, d'après PETERSEN), chiffre qui s'élève à 2,88 0/0 si on le calcule sur la matière organique seule après défalcation des cendres. Dans cinq analyses de *lignites* (t. I, p. 28) la teneur en azote oscille entre 0,50 0/0 (Lignite de Webau, d'après F. FISCHER : 0,61 0/0 après défalcation des cendres) et 2,40 0/0 (Lignite de Antostolln, Bavière, d'après KLINGER et REICHARDT : 3,94 0/0 après défalcation des cendres). Sur dix-sept échantillons de *houilles* (t. I, p. 30) la teneur en azote varie de 0,60 0/0 (Charbon de la Saar, Duttweiler, d'après F. FISCHER) à 2,32 0/0 (Eschelbach, Bavière, d'après SCHAFHAEUTEL). Pour sept échantillons d'*anthracites* (t. I, p. 30) nous trouvons des chiffres allant de 0,21 0/0 (Pays de Galles, Jones a. C⁰, d'après LECORNU) à 2,85 0/0

1. R. WAGNER et F. FISCHER. *Traité de Chimie industrielle*, traduit par L. GAUTIER, 4^e édit., Paris, 1901.

(Vizille, Isère, d'après JACQUELAIN : 2,91 0/0 après défalcation des cendres). Nous trouvons enfin (t. I, p. 31) quelques combustibles spéciaux : *boghead* écossais à 0,77 0/0 (1,02 0/0 net) et *torbanite* à 0,55 0/0 (0,68 0/0 net), *cannel-coal* à 2,27 0/0 (2,83 0/0 net), *stellarite* à 5,58 0/0 (5,73 0/0 après défalcation des cendres).

Cette série de chiffres nous donne l'ordre de grandeur de l'azote par rapport à la matière organique dans les combustibles minéraux :

Teneur en azote :

Tourbes	0,77 — 2,88 0/0
Lignites	0,61 — 3,94
Houilles	0,60 — 2,32
Anthracites	0,21 — 2,91
Bogheads	0,68 — 1,02
Cannel-coal	2,83
Stellarite	5,73

Dans certains de ces combustibles, l'azote atteint la teneur des produits que j'ai obtenus expérimentalement par la condensation du glucose avec le glycolle; dans beaucoup d'autres, l'azote représente une fraction très importante de cette teneur. Bien que celle-ci ne soit pas par elle-même très élevée, on n'oubliera pas que, grâce à l'association des molécules sucrées, une petite quantité d'azote a le pouvoir de déclencher la déshydratation et l'humification d'une grande quantité de matière ternaïre.

D'autre part il semble bien que ce soit l'azote qui joue le rôle de protecteur et de conservateur vis-à-vis de la matière carbonée, en la faisant passer précisément sous une forme condensée qui résiste à l'oxydation ou aux autres modes de destruction, alors que la matière hydrocarbonée primitive aurait été détruite très rapidement. L'azote est l'élément d'épargne dont la fixation permet à la matière organique de durer et de constituer des dépôts fossiles. Aussi voit-on cet azote demeurer toujours dans les dépôts, alors même que la partie carbonée subit peu à peu une lente désagrégation. C'est ainsi que DETMER (1), en prélevant dans une même formation tourbeuse des échantillons à des profondeurs croissantes, c'est-à-dire d'âge de plus en plus ancien, a trouvé les chiffres suivants :

1. DETMER. *Jahresb. üb. Chemie*, 1873, 845.

	C	H	O	N	Cendres
Tourbe brune de la surface.	57,75	5,43	36,06	0,80	2,72
Tourbe presque noire, à 2 m. 50 de profondeur .	62,02	5,21	30,67	2,10	7,42
Tourbe noire, à 4 m. 60 de profondeur	64,07	5,01	26,87	4,05	9,16

Cette comparaison illustre la ténacité avec laquelle l'azote persiste dans la matière organique, où sa teneur relative s'accroît à mesure de la disparition du carbone.

Ceci m'amène à dire qu'il serait bon de préciser, dans les ouvrages de Géologie, en quoi consiste le rôle de l'oxydation dans la genèse des combustibles minéraux. Par exemple, dans son *Traité* bien connu, A. de LAPPARENT (1) écrit que les tourbes « consistent en débris végétaux plus ou moins altérés, mais encore visiblement organisés, que réunit une substance amorphe, humique ou ulmique. Cette dernière, qui forme le ciment de la masse, résulte d'une décomposition complète de la matière végétale, transformée par une oxydation graduelle ». Pour éviter tout malentendu, il serait utile de spécifier que la matière humique restante n'est pas la partie de la matière organique qui a subi l'oxydation, mais au contraire *la partie qui a résisté à l'oxydation* pendant que le reste disparaissait.

On le voit bien en étudiant des analyses comparatives de sphaigne vivant et de tourbe, qui sont précisément citées dans le même ouvrage (2) :

	C	H	O	N
Sphaigne	49,88	6,54	42,42	1,16
Tourbe.	59,50	5,50	33,00	2,00

Si l'on calcule les formules empiriques auxquelles conduiraient de telles compositions centésimales, on trouve :

Sphaigne	C ^{50,17} H ^{78,92} O ^{31,75} N
Tourbe.	C ^{34,77} H ^{38,50} O ^{14,44} N
	C ^{15,40} H ^{40,42} O ^{17,31}

La différence, c'est-à-dire la matière disparue pendant la transfor-

1. A. de LAPPARENT. *Traité de Géologie*, 3^e édit., Paris, 1893. Voir t. I, p. 336.

2. A. de LAPPARENT, 3^e éd., t. I, p. 334.

mation du sphaigne en tourbe, est donc, pour chaque atome d'azote conservé, de la forme $C^{16}H^{14}O^{18}$ ou $C^{15}H^{14}O^{17}$, ce qui peut s'écrire encore $(C^{16} + H^6 + 18 H^2O)$ ou $(C^{15} + H^6 + 17 H^2O)$. Outre une certaine quantité de carbone et d'hydrogène, la matière a donc perdu une grande quantité d'eau : elle a subi un phénomène de déshydratation comparable à celui par lequel j'ai caractérisé la condensation des sucres avec les aminoacides.

Outre le rôle de l'azote et le phénomène de déshydratation, mes recherches me conduisent encore à examiner le rôle éventuel de la pression, de la température, des microorganismes (1). En ce qui concerne la pression, s'exerçant pendant un temps limité à la température ordinaire, il semble bien que les géologues aient renoncé à y chercher un facteur de la houillification. E. FRÉMY (2) n'a pu obtenir, par compression de la cellulose, des feuilles, du bois, à la température ordinaire, rien qui ressemblât à de la houille. Malgré les apparences superficielles observées par W. SPRING (3), qui avait cru transformer la tourbe en houille par une pression de 6.000 atmosphères, R. ZEILLER (4), à son tour, n'a constaté aucune transformation d'ordre chimique en comprimant, à 2.000-10.000 kilogrammes par centimètre carré, la tourbe, le lignite, le charbon papyracé de la Russie centrale.

Au contraire, en élevant la température, E. FRÉMY (5) a pu, en chauffant sous pression, vers 200° - 300° , du sucre, de l'amidon, des gommes, et surtout l'acide ulmique dérivé de la vasculose, obtenir des matières noires ressemblant à de la houille, insolubles dans les acides et les alcalis ainsi que dans les dissolvants neutres. Tout récemment F. BERGIUS (6) a obtenu des résultats du même genre en chauffant dans un obus, vers 300° - 350° , de la cellulose, du bois, de la tourbe, avec une grande quantité d'eau. La surchauffe de l'eau développe une

1. L. C. MAILLARD. Formation d'humus et de combustibles minéraux sans intervention de l'oxygène atmosphérique, des microorganismes, des hautes températures, ou des fortes pressions (*C. R. Acad. Sc.*, 155, 1554, 1912).

2. E. FRÉMY. Recherches chimiques sur la formation de la houille (*C. R. Acad. Sc.*, 88, 1048, 1879).

3. W. SPRING. Recherches sur la propriété que possèdent les corps de se souder sous l'action de la pression (*Ann. de Chim. et Physiq.*, 5^e s., 22, 170, 1881).

4. R. ZEILLER (*Bull. Soc. géol. France*, 3^e s., 12, 680).

5. E. FRÉMY. Recherches chimiques sur la formation de la houille (*C. R. Acad. Sc.*, 88, 1048, 1879).

6. F. BERGIUS. Die Anwendung von hohen Drucken bei chemischen und chemisch-technischen Vorgängen (*Zeitschr. f. Elektrochemie*, 18, 660, 1912).

pression supérieure à 100 atmosphères. On obtient une sorte de charbon très gras, ainsi que des gaz CO_2 et CH_4 . La composition du charbon dépend de la température et de la durée du chauffage : ces deux facteurs augmentent la teneur en carbone. Par exemple, avec la cellulose, on obtient des charbons à peu près identiques par un chauffage de 8 heures à 340° ou de 64 heures à 310° . En étudiant les relations qui relient la vitesse de transformation à la température, F. BERGIUS arrive à supputer que la formation de la houille dans la nature, aux environs de 40° , exigerait 7-8 millions d'années.

Ces questions de température et de pression ne concernent évidemment que les stades finaux de la formation de la houille, où entre en jeu un véritable métamorphisme, et non l'humification initiale, seul stade auquel mes condensations aient la prétention d'être comparées. Mais comme mes expériences ont mis en lumière une influence puissante des corps azotés sur la déshydratation et l'humification de la matière ternaïre, peut-être ne serait-il pas superflu de reprendre, avec adjonction d'ammoniaque ou de corps aminés, les études de température et de pression, pour voir si l'on n'obtiendrait pas alors une accélération des phénomènes.

Reste à examiner, à la lumière des notions nouvelles acquises par mes recherches, quel a pu être le rôle des *microorganismes* et particulièrement des bactéries dans la formation de la houille. Les belles recherches de B. RENAULT ont mis hors de doute la pullulation bactérienne qui s'est produite dans les débris végétaux destinés à fournir la houille, et cette constatation semble avoir induit les géologues à considérer le passage de la cellulose à la houille comme un phénomène direct, attribuable en totalité, pour la partie chimique au moins, à ces bactéries qui l'auraient réalisé par un processus fermentatif spécial. Il y aurait eu une « fermentation houillère », comme il y a une fermentation lactique, une fermentation alcoolique, etc.

Cette conception a des variantes, mais qui toujours attribuent aux microorganismes la formation même de la matière humique. E. FRÉMY (1) expose que la houille ne dérive pas directement des organes végétaux dont on y retrouve les empreintes, mais que ces empreintes n'ont fait que s'appliquer sur une masse humique pâteuse formée d'autre part par une désagrégation complète, et qui devait plus tard se transformer en houille véritable, par la chaleur et la pression, comme le fait au laboratoire la matière tourbeuse. Il distingue donc

1. E. FRÉMY. Recherches chimiques sur la formation de la houille (*C. R. Acad. Sc.*, 88, 1048, 1879).

dans la formation de la houille deux actes successifs : 1^o une « fermentation tourbeuse », 2^o une transformation métamorphique de la tourbe en houille. Ici encore la « fermentation tourbeuse » serait tout entière l'œuvre des bactéries.

Cependant on conçoit mal la formation indéfinie, par œuvre bactérienne, des matières humiques de la tourbe, tout simplement à cause des propriétés antiseptiques bien connues de ces matières. « Le rôle des microorganismes dans la fermentation anaérobie qui a donné naissance à la tourbe, écrit très judicieusement E. HAUG (1), est encore mal connu dans ses détails... D'autre part la fermentation a dû s'arrêter à un moment déterminé, car l'acide ulmique est toxique pour ces organismes, et la tourbe en renferme une quantité assez élevée, quoique les eaux qui drainent les tourbières en entraînent en dissolution une masse considérable ». Déjà J. FRÜH (2) pensait que les bactéries ne jouent vraisemblablement aucun rôle important dans la tourbification : il se basait sur la bonne conservation des membranes d'algues fragiles, membranes où l'on retrouve la cellulose inaltérée après l'avoir débarrassée par la potasse de l'ulmine qui l'imprègne. J. FRÜH a constaté que l'ulmine artificielle de saccharose, conservée humide, n'est le siège d'aucun développement bactérien. Il cite encore une communication de LESQUEREUX, de Columbus (Ohio), d'après laquelle l'eau brune du Mississippi, qui sort des marais tourbeux du Minnesota et conserve sa couleur jusqu'au confluent du Missouri, doit à sa teneur en acide humique la propriété de se conserver sans altération : les bateaux s'en approvisionnent pour les longs voyages sur mer.

L. LEMIERE (3) suppose que les diastases des végétaux ou des microbes transforment d'abord les hydrates de carbone en une gelée humique où pullulent les microorganismes et qui sert de base à tous les combustibles fossiles. Le milieu devenant ensuite anaérobie, les bactéries dédoubleraient les hydrates de carbone en gaz (CO_2 , CH_4) et en hydrocarbures liquides ou solides qui formeraient le combustible. La fermentation s'arrêterait d'elle-même par l'action antiseptique des hydrocarbures produits ; et la composition du produit final serait réglée par l'importance et la durée relative de ces diverses phases.

1. E. HAUG, *Traité de Géologie*, Paris, 1907. Voir t. I, p. 430.

2. J. FRÜH, *Kritische Beiträge zur Kenntniss des Torfes (Jahrb. d. k. k. geolog. Reichsanstalt, 35, 723, 1885)*.

3. L. LEMIERE, *Sur la transformation des végétaux en combustibles fossiles (Congrès géol. internat., 8^e session, p. 502, Paris, 1901)*.

Il me semble que la réaction générale des sucres et des aminoacides, telle que je l'ai découverte, est de nature à apporter ici les éclaircissements nécessaires. Ainsi que je l'ai déjà dit, les microorganismes peuvent intervenir, concurremment ou non avec les diastases des végétaux supérieurs, pour *préparer* les matériaux de l'humification ; mais leur rôle doit se borner à la décomposition des polysaccharides et des protéiques végétaux ou animaux, pour libérer d'une part les sucres, d'autre part les polypeptides, les acides aminés, l'ammoniaque ou les amines diverses, dont la réaction sur les sucres engendrera les matières humiques.

Mais après cette phase de décomposition hydrolytique, toute préparatoire, le rôle des bactéries est terminé. La formation elle-même des matières humiques ne leur appartient plus : c'est un phénomène *aseptique*, qui ne repose que sur l'automatisme des réactions chimiques en dehors de toute intervention des êtres vivants.

Nous ne pouvons plus, comme au temps de E. FRÉMY, considérer dans le phénomène houiller seulement deux actes, l'un fermentatif, l'autre métamorphique. Il me semble, toutes réserves faites sur les considérations purement géologiques qui ne sont pas de mon ressort, qu'à l'heure actuelle notre conception *chimique* de la houillification doit comprendre *trois actes nettement distincts* :

1^o *Acte biologique*, diastasique ou microbien, purement préparatoire : décomposition des polysaccharides et des protéiques, libération des sucres et des corps aminés ;

2^o *Acte chimique* purement automatique, aseptique : fixation de l'azote sur la fonction aldéhydrique ou cétonique des sucres, phénomène intense de déshydratation et d'humification ;

3^o *Acte métamorphique* : compression, échauffement, distillation, avec les modifications chimiques corrélatives : formation définitive des houilles et des anthracites.

Relations avec les substances mélanoidiques. — Sous le nom de *mélanoïdines* ou mieux *acides mélanoidiques*, on a désigné des substances fortement colorées en brun noirâtre, qui prennent naissance dans la décomposition des matières protéiques par les acides.

C'est O. SCHMIEDEBERG (1) qui leur a attribué cette dénomination, après avoir étudié leurs relations avec les albuminoïdes : « Si on chauffe » pendant assez longtemps des substances albuminoïdes avec des aci-

1. O. SCHMIEDEBERG. Ueber die Elementarformeln einiger Eiweisskörper und über die Zusammensetzung und die Natur der Melanine (*Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol.*, 39, 1, 1897).

« des minéraux assez concentrés, elles se dissolvent d'abord dans
 « ceux-ci ; le liquide se colore ensuite en violet ou en rougeâtre, prend
 « progressivement une coloration brune qui devient toujours plus fon-
 « cée, jusqu'à ce que finalement se séparent des masses floconneuses
 « d'un brun noir, qui dans leurs propriétés concordent complètement
 « avec les pigments animaux noirs solubles dans les alcalis, mais paraiss-
 « sent dériver de l'albumine d'une autre manière que les mélanines et
 « acides mélaniques naturels, et pour cette raison peuvent être nom-
 « més *mélanoïdines* et *acides mélanoïdiques* (1).

La proportion de corps mélanoïdiques fournie par les albumines n'est pas grande : une quantité importante de sérumalbumine de cheval pure, chauffée avec HCl à 25 0/0, n'en donne qu'une quantité « extrêmement faible ». Purifié par une série de redissolutions dans la potasse et de précipitations par HCl, lavé à l'alcool, l'*acide mélanoïdique* constitue à l'état sec une masse noire à cassure brillante, friable, qui ne se redissout que lentement dans la potasse, même en chauffant. Le simple chauffage au sein de l'eau de la substance fraîchement précipitée fait décroître notablement sa solubilité dans les alcalis. Les solutions très concentrées sont noires, les solutions plus étendues sont brun café.

Cet acide mélanoïdique contient un peu de soufre qui n'a pu être dosé ; les autres éléments ont donné à l'analyse :

C	66,21	66,34
H	5,32	5,67
N	5,64	5,50

Un autre *acide mélanoïdique* a été préparé au moyen de la peptone de Witte (fibrinoses) chauffée tous les jours au bain-marie avec de l'acide phosphorique, pendant 2 mois. Le liquide sirupeux, coloré en brun noir foncé, est alors fortement dilué, puis chauffé avec du carbonate de baryum qui fixe l'acide mélanoïdique. Le précipité barytique, bien lavé et bouilli avec une solution de K^2CO^3 , lui cède le pigment, qui est précipité par l'acide acétique, et purifié comme précédemment. La substance, de même apparence que la précédente, a donné à l'analyse :

C	60,32	60,36
H	4,85	4,87
N	8,09	
S	0,96	

1. O. SCHMIEDEBERG. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol.*, t. 39, p. 65.

Nous laisserons de côté les formules compliquées par lesquelles O. SCHMIEDEBERG cherche à rendre compte de la naissance des mélanoidines à partir des albumines, notamment par l'intermédiaire du « groupe antialbumide ». Pour apprécier la valeur de ces formules nous nous contenterons d'emprunter à l'auteur lui-même la réflexion suivante : « D'après l'équation, la fibrinose devrait fournir plus de 80 0/0 d'acide mélanoidique, tandis que le rendement en fait est extrêmement faible. Il atteint au plus 1-2 0/0 de l'albumine employée » (1). O. SCHMIEDEBERG lui-même pense donc que la formation des mélanoidines n'est qu'une réaction tout accessoire, infime au point de vue quantitatif, qui se déroule à côté de la réaction régulière hydrolysant les albumines en albumoses, peptones et acides aminés.

A leur tour R. H. CHITTENDEN et A. H. ALBRO (2) ont voulu étudier la formation de substances mélaniques à partir des albuminoïdes. Une « antialbumide » spécialement préparée a été soumise à l'ébullition avec H^2SO_4 à 10 0/0, pendant un temps qui atteignait respectivement 79 heures et 110 heures. Les corps noirâtres obtenus avaient la composition suivante :

	« Mélanine » 79 heures	« Mélanine » 110 heures
C	54,26	58,05
H	6,94	7,39
N	12,00	11,92
S	7,70	4,35

De même, en partant d'une « hémipeptone » préparée en hydrolysant par H^2SO_4 à 3 0/0 de l'albumine coagulée, et en faisant bouillir cette hémipeptone pendant 98 heures dans H^2SO_4 à 10 0/0, les auteurs ont obtenu un pigment représentant 1 0/0 de l'hémipeptone, et qui offrait la composition suivante :

C	61,50
H	3,97
N	10,23
S	2,98

La proportion de l'azote entré dans la constitution des substances bru-

1. O. SCHMIEDEBERG. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol.*, t. 39, p. 70.

2. R. H. CHITTENDEN et A. H. ALBRO. The formation of Melanin or Melanin-like Pigments from Albumins (*Amer. Journ. of Physiol.*, 2, 291, 1899).

nes, par rapport à la totalité de l'azote contenu dans la matière albuminoïde originelle, a été déterminée par A. KOSSEL et F. KUTSCHER (1) ; ces auteurs laissent aux substances brunes le nom de *matières humiques*, employé depuis G. J. MULDER (2) qui avait le premier montré la formation de corps du genre humique dans l'action des acides minéraux sur les albuminoïdes. A. KOSSEL et F. KUTSCHER exécutaient leurs recherches sur les albuminoïdes au moyen de l'hydrolyse sulfurique : avec certaines espèces on trouve un peu de matière brune précipitée en flocons ; avec toutes, le liquide d'hydrolyse est brun foncé. Lorsque dans ce liquide on ajoute de l'eau de baryte jusqu'à presque saturation de H^2SO^4 , le précipité de BaSO^4 entraîne une partie des produits bruns ; si dans un échantillon de liquide on dose l'azote avant et après la précipitation barytique, on connaît la quantité d'azote entraîné sous forme de matières humiques par le précipité de BaSO^4 . Les auteurs distillent ensuite le liquide avec de la magnésie, pour doser l'azote passé sous forme ammoniacale, et ajoutent alors de l'eau de baryte jusqu'à réaction alcaline : on recueille un nouveau précipité qui a fixé encore des matières brunes, et on détermine encore par différence la quantité d'azote ainsi entraîné.

Voici la fraction de l'azote total ainsi entraîné à l'état d'« azote humique », pour diverses substances albuminoïdes :

Salmine	1,3 0/0
Clupéine	4
Sturine	4,5
Cycloptérine	9,4

Histone du thymus de veau :

{ N humique insoluble	0,98	{	14,92
{ N entraîné par Mg-Ba	13,94		

Histone du sperme de cabillaud :

{ N humique insoluble	0,8	{	5,8
{ N entraîné par BaSO^4	2,6		
{ N entraîné par Mg-Ba	2,4		

Glutencaséine :

{ N entraîné par BaSO^4	15,64	{	16,36
{ N entraîné par Mg-Ba	0,72		

1. A. KOSSEL et F. KUTSCHER. Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper (*Z. physiol. Chem.*, 31, 165, 1900).

2. G. J. MULDER. *Journ. f. prakt. Chem.*, 21, 343, 1840.

Glutenfibrine	10,78
Gliadine	11,78
Mucédine	10,36
Zéine	11,83

C'est dans ce travail que A. KOSSEL et F. KUTSCHER étudiaient la répartition de l'azote de la molécule albuminoïde en 4 groupes structuraux engendrant respectivement : l'urée, les acides diamminés, les acides monoaminés, l'ammoniaque. « Ici s'ajoute peut-être encore, comme « 5^e groupe, le groupe formateur des substances humiques. Mais l'existence de ce dernier en tant que groupe azoté est douteuse, car il est « possible que la teneur en azote des substances humiques repose seulement sur une réaction accessoire » (1).

Le caractère secondaire de la formation des substances humiques apparaît en effet dans les recherches antérieurement effectuées sur l'urine par L. v. UDRANSKY (2). Cet auteur concentre l'urine normale, à 60°, jusqu'au sixième de son volume primitif, ajoute au liquide concentré et refroidi le dixième de son volume de HCl, abandonne 48 heures, et filtre. Le filtrat est alors bouilli au réfrigérant à reflux ; presque aussitôt apparaissent des matières brunes qui se séparent en fins flocons noirâtres : 2 heures suffisent pour former en majeure partie ces substances, dont la quantité n'augmente plus après 18 heures. Purifiée par redissolutions dans les alcalis et précipitations par les acides, puis séchée, la substance forme une masse écailleuse, brillante, friable, d'un noir brun, presque totalement insoluble dans l'eau froide, l'alcool étendu, l'éther, le chloroforme, les acides étendus, très difficilement soluble dans l'eau chaude, l'alcool absolu, l'éther de pétrole, l'acide sulfurique et l'acide chlorhydrique concentrés, mais bien soluble dans l'alcool amylique et dans l'ammoniaque concentrée, très facilement soluble dans la potasse ou la soude. La matière présente la composition suivante :

	Echant. I	Echant. II
C	55,31	56,32
H	4,38	4,16
N	10,29	8,44

1. A. KOSSEL et F. KUTSCHER. *Z. physiol. Chem.*, t. 31, p. 208.

2. L. v. UDRANSKY. Ueber die Beziehung einiger, in dem Harn bereits vorgebildeten, oder daraus durch einfache Prozeduren darstellbaren Farbstoffe zu den Huminsubstanzen (*Z. physiol. Chem.*, 11, 537, 1887 ; 12, 33, 1888).

Fondue avec la potasse, elle dégage l'azote sous forme d'ammoniaque, et donne, en outre, de l'acide formique et d'autres acides gras, de l'acide protocatéchique, et une substance brune résistante contenant $C = 62,0-62,7\ 0/0$, $H = 3,7-4,0\ 0/0$, tout à fait semblable aux acides hymatomélaniques de F. HOPPE-SEYLER. Ces substances formées par l'ébullition de l'urine avec HCl, se comportent donc, l'azote mis à part, exactement comme les substances humiques étudiées par F. HOPPE-SEYLER (1). En raison de ce fait, L. v. UDRANSKY les considère comme des *substances humiques*, et cherche à les rattacher à des hydrates de carbone qui préexisteraient dans l'urine.

Or on sait que l'urine normale possède toujours un certain pouvoir réducteur, qu'elle doit entre autres à des conjugués glycuroniques : L. v. UDRANSKY a constaté que, après la formation des substances humiques, le pouvoir réducteur avait totalement disparu, et que, de plus, la quantité de matières humiques obtenue était exactement proportionnelle au pouvoir réducteur originel de l'urine employée. (La proportion de matière humique fournie par l'urine normale est d'ailleurs faible, comprise entre 0,023 0/0 et 0,033 0/0).

D'autre part, les substances humiques obtenues par l'auteur sont très riches en azote, et comme cet azote est assez solidement fixé pour ne s'éliminer que par *fusion* avec la potasse, on ne peut le négliger. « Il était tout d'abord à penser, dit l'auteur, que l'ammoniaque qui se « forme pendant l'ébullition de l'urine avec HCl, serait ce qui entre à « l'état naissant dans la combinaison humique et qui cause la teneur « en azote de celle-ci ». Mais il déclare « n'avoir trouvé dans la littérature absolument aucune donnée sur le point de savoir si les substances humiques peuvent entrer avec l'ammoniaque en de telles combinaisons, où l'azote n'est pas seulement ajouté d'une façon lâche, « mais se trouve en liaison plus solide » (2).

L. v. UDRANSKY dissout donc 20 gr. de glucose et 5 gr. d'urée dans 500 cc. d'eau, et fait bouillir pendant 18 heures au réfrigérant à reflux avec 10 vol. 0/0 d'acide chlorhydrique. Il obtient une quantité importante de matière humique, offrant la composition :

C	57,79 0/0
H	3,96
N	6,73

1. F. HOPPE-SEYLER. Ueber Huminsubstanzen, ihre Entstehung und ihre Eigenschaften (*Z. physiol. Chem.*, 13, 66, 1888).

2. Les travaux de P. THÉNARD lui avaient évidemment échappé.

et qui par fusion potassique donne, outre l'ammoniaque, de l'acide oxalique, de l'acide formique et d'autres acides gras, de l'acide proto-catéchique, de la pyrocatéchine, et un reste exempt d'azote renfermant C = 62,79 0/0, H = 4,12 0/0.

Dans une expérience parallèle, 20 gr. d'urée (au lieu de 5 gr.) sont mis en présence de 20 gr. de glucose, et la matière humique obtenue présente cette fois la composition :

C	53,55 0/0
H	4,34
N	13,61

De cette variété de composition, L. v. UDRANSKY tire cette conclusion que « les substances humiques, au moment de leur formation, suivant « la quantité d'ammoniaque en présence, sont en état de prendre des « quantités différentes de celle-ci, et par suite leur teneur en azote doit être « considérée comme accidentelle, et non essentielle » (1). Nous aurons à discuter tout à l'heure cette appréciation.

L'urine diabétique, qui réalise naturellement les conditions de l'expérience, fournit une telle quantité de matières humiques qu'il suffit de 40 heures de chauffage pour voir le liquide prendre une consistance de bouillie. L'analyse a donné :

C	55,75 0/0
H	4,25
N	9,96

pour une substance fournissant par fusion potassique les produits habituels, y compris le reste non azoté de teneur C = 63,03 0/0, H = 3,69 0/0.

Les recherches de L. v. UDRANSKY nous ont donc appris que, outre l'ammoniaque et ses sels (P. THÉNARD), outre les acides aminés et les polypeptides (L. C. MAILLARD), il faut compter (au moins indirectement) l'urée parmi les corps azotés susceptibles de donner naissance aux matières humiques en réagissant sur les sucres. Mais je ne puis me ranger à son opinion lorsqu'il considère la présence de l'azote dans ces matières humiques comme fortuite et non essentielle; il va même jusqu'à écrire : « Si l'on pouvait éliminer complètement de l'urine l'azote, « sans détruire la substance réductrice, alors on pourrait vraisemblablement obtenir de cette urine des substances humiques exemptes « d'azote » (2).

1. « ... und dass daher ihr Stickstoffgehalt als ein zufälliger, unwesentlicher betrachtet werden muss » (*Z. physiol. Chem.*, t. 12, p. 44).

2. L. v. UDRANSKY. *Z. physiol. Chem.*, t. 12, p. 47.

Cependant L. v. UDRANSKY avait lui-même insisté sur ce fait que l'azote est inclus dans la molécule avec une solidité telle, que pour l'en chasser il faut recourir à la *fusion* potassique. Quant à la variation dans la teneur en azote des produits analysés, n'est-il pas plus sage de la mettre sur le compte du caractère complexe, et non unitaire, de la matière brune recueillie ? L'impuissance où nous sommes à l'heure actuelle de séparer les espèces chimiques différentes qui peuvent constituer cette matière, ne doit pas nous conduire à nier d'avance l'existence même de ces espèces définies.

En résumé les substances mélanœïdiques ou humiques obtenues dans l'hydrolyse acide des protéiques ou des tissus animaux ou végétaux (opération dont nous pouvons rapprocher jusqu'à un certain point l'ébullition de l'urine avec les acides), appartiennent à mon avis au même groupe que les corps obtenus dans mes recherches par l'action des acides aminés sur les sucres.

Elles ont les mêmes propriétés générales, une composition centésimale du même ordre, témoignant d'une forte déshydratation, et certaines ont une teneur en azote tout à fait comparable. D'autres ont une teneur en azote plus élevée, mais outre que nous ne sommes pas fixés sur le maximum de teneur relative que peut représenter l'entrée d'un seul atome d'azote dans une de ces molécules, on conçoit que non seulement des aminoacides simples, mais aussi des polypeptides, peuvent prendre part à la genèse de ces corps, apportant d'un seul coup une chaîne à plusieurs atomes d'azote, et relevant ainsi le taux de cet élément.

Enfin certaines de ces mélanœïdines sont riches en soufre : ceci doit évidemment résulter de l'entrée en jeu d'un aminoacide sulfuré, la cystéine. Il faudrait même que la cystéine eût une tendance particulière à former des mélanœïdines, tendance plus marquée que chez les aminoacides voisins ; mais doit-on s'en étonner, quand on sait que parmi les divers aminoacides qu'il m'a été donné d'étudier, c'est l'alanine, squelette moléculaire de la cystéine, qui a paru le plus actif ?

Les aminoacides libérés par l'hydrolyse acide, ou même les polypeptides intermédiaires, doivent réagir sur les molécules sucrées qui peuvent se trouver dans le liquide, ou tout au moins sur des molécules aldéhydiques ou cétoniques capables d'agir à la façon des sucres. Aussi conçoit-on que l'hydrolyse de matériaux divers doive donner des quantités diverses de mélanœïdines. En hydrolysant le gluten pour la préparation de l'acide glutamique, j'ai vu moi-même se produire des quantités considérables de matière noirâtre riche en azote, peut-être à cause d'un peu d'amidon resté dans le gluten et fournissant du glucose,

peut-être par suite de formation d'acide pyrrolidonecarbonique ou d'autres produits d'altération. Lorsqu'on veut soumettre directement à l'hydrolyse des matériaux riches en polysaccharides, des grains de céréales par exemple, on n'obtient qu'une pâte brune, ayant l'aspect du pain d'épices, et où l'azote est entré en combinaison mélanoidique.

Mais il y a, dira-t-on, des substances protéiques dont la molécule ne renferme pas de sucres, et pour lesquelles l'explication ne serait pas valable. Précisément, la réaction que j'ai découverte me paraît indiquer la reprise de l'enquête sur la présence des sucres; car on conçoit qu'en plus d'une circonstance ces corps, transformés en mélanoidines, aient pu échapper à l'analyse.

Enfin il ne faut pas oublier qu'à défaut de molécules sucrées préexistantes, l'action même des réactifs peut faire subir à certains des produits primaires de l'hydrolyse des altérations secondaires créant des fonctions aldéhydiques ou cétoniques, fonctions capables de se condenser avec l'azote des aminoacides, de l'ammoniaque, des amines ou d'autres corps du même genre. De là vient peut-être la différence que l'on observe dans le brunissement infligé, suivant la nature de l'agent d'hydrolyse, à une même matière première. Peut-être serait-il intéressant de reprendre, en s'inspirant de ces idées, l'étude de l'acide fluorhydrique, que L. HUGOUNEQ et A. MOREL (1) ont préconisé comme le moins mélanisant de tous ces agents d'hydrolyse.

On remarquera que dans ce chapitre je n'ai parlé que des *mélanoidines*, en évitant de faire allusion aux *mélanines* véritables (de la choroïde, des poils, des tumeurs sarcomateuses, etc.). C'est que dans la constitution des mélanines entrent en jeu des molécules cycliques, la tyrosine certainement, le tryptophane peut-être, et qu'il y aura lieu dans l'avenir de distinguer soigneusement la part qui, dans la genèse des corps colorés, revient aux molécules cycliques, et aux simples aminoacides linéaires. C'est une question qui m'entraînerait trop loin des limites de mon travail actuel.

Relations avec les matières brunes des industries alimentaires. — Tout ce qui a été dit antérieurement permet de comprendre que l'on doit assister à la formation de substances brunes dans toutes les circonstances où demeureront en contact, d'une part des sucres, et d'autre part des aminoacides, des amines, des composés ammonia-

1. L. HUGOUNEQ et A. MOREL. Sur un perfectionnement dans la technique d'hydrolyse des matières protéiques. L'emploi de l'acide fluorhydrique et ses avantages (*Bull. Soc. Chim.*, 4^e s., 3, 1146, 1908).

caux, etc... Cette formation de substances brunes sera d'autant plus importante que la concentration des milieux et leur température seront plus élevées.

Les industries alimentaires, celles surtout qui traitent des matériaux d'origine végétale, nous offrent un excellent exemple de ces phénomènes, parce qu'elles manipulent simultanément des sucres (ou des polysaccharides générateurs) et des aminoacides (ou des protéiques générateurs).

C'est dans ce domaine que j'ai eu connaissance, après l'exécution et la publication sommaire de mes propres recherches, d'une antériorité, partielle d'ailleurs et très limitée. Elle est relative à l'industrie du *maltage*. A. R. LING (1) rappelle ce précepte bien connu empiriquement des malteurs praticiens, que lors du tourailage le malt doit être maintenu humide à 50° 63° pendant assez longtemps, si l'on veut qu'au dernier stade du séchage il prenne une bonne coloration. A. R. LING explique ce fait par l'hydrolyse des protéiques et des amylacés pendant ce stade préparatoire ; les sucres et les corps aminés résultant de l'« autodigestion » se combineraient d'abord en substances incolores, probablement du genre de la glucosamine, qui soumises plus tard à une température plus élevée, se décomposeraient avec coloration brunâtre.

A. R. LING a reproduit expérimentalement la coloration brunâtre par le glucose et l'asparagine : « Si l'on chauffe peu de temps du glucose vers 55° avec un corps tel que l'asparagine, il se produit une « combinaison, mais sans production de couleur. Si la combinaison est « alors chauffée au bain-marie à 100°, on observe un fort brunissement. Une telle coloration ne se produit pas quand on chauffe le « glucose seul » (2).

A. R. LING s'est d'ailleurs borné à la brève indication qualitative que je reproduis ici intégralement : il n'a signalé ni le dégagement de CO², ni la déshydratation du sucre, ni la présence de l'azote dans les produits, ni l'identité de ceux-ci avec les matières humiques et mélanoidiques. Il semble que son attention se soit limitée à l'industrie du maltage, car je n'ai pas vu jusqu'ici, dans les recueils de Chimie pure, la description du phénomène que j'ai retrouvé dans toute sa

1. A. R. LING. *Malting (Journ. Institute of Brewing, 34, 494, 1908).*

2. « If ordinary glucose be heated for a short time at about 130° with such a compound as asparagine, combination occurs, without however the production of colour. If the resulting product be then heated in a boiling water bath at 212°, much darkening occurs. No such production of colour is produced by heating the glucose alone. This is quite a parallel case to the production of colour in malt » (*Journ. Institute of Brewing, t. 34, p. 514*).

généralité et dont l'étude quantitative m'a révélé des conséquences de portée très étendue.

Bien d'autres circonstances industrielles sont d'ailleurs susceptibles d'une interprétation du même genre. Par exemple, dans la coloration des *mélasses de sucrerie*, doit intervenir la combinaison des sucres réducteurs avec les corps azotés, amines, aminoacides, bétaines, etc... Il est même intéressant de signaler que dès 1861, P. THÉNARD (1), étudiant l'action réciproque de l'ammoniaque, des phosphates et des sucres, en tirait « des conclusions propres à jeter un nouveau jour sur le mode de formation... des produits noirs de la mélasse. ».

La fabrication du *pain d'épices*, où entrent des miels ou des sirops, relève sans doute de la même réaction, en ce qui concerne la coloration de la masse. Peut-être même faut-il y joindre certains pains grossiers, le *pumpernickel* par exemple, dans la fabrication duquel la panification serait précédée, paraît-il, d'une sorte de fermentation spéciale, capable sans doute de libérer des sucres et des corps aminés.

Chacun aura l'occasion d'observer des cas du même genre, relevant du phénomène que j'ai découvert et signalé dans toute sa généralité.

1. P. THÉNARD. Note sur l'action réciproque des phosphates, de l'ammoniaque et de divers corps neutres organiques les uns sur les autres (*C. R. Acad. Sc.*, 53, 1019, 1861).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Au cours du présent travail, j'ai pu établir les données nouvelles que voici :

PREMIÈRE PARTIE

Action de la glycérine sur le glyocolle. (Synthèse de la cyclo-glycyl-glycine et des chaînes polyglycyliques paires)

Le glyocolle maintenu à 170° en présence d'un excès de glycérine se transforme en totalité, par voie d'anhydrisation.

Le produit fondamental de l'anhydrisation du glyocolle à 170°, en présence d'un excès de glycérine, est la *cyclo-glycyl-glycine* $\left[\begin{array}{c} \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} \\ | \qquad \qquad | \\ \text{CO} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{NH} \end{array} \right]$,

substance déjà décrite par TH. CURTIUS sous le nom de glycinanhydride, et par E. FISCHER sous ceux de 2.5. diacipipérazine ou 2.5. dikétopipérazine. Cette substance a été identifiée par l'analyse, les propriétés, la transformation en glycylglycine $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH}$.

La condensation directe du glyocolle au sein de la glycérine est, à l'heure actuelle, le procédé le plus pratique pour la préparation de la cyclo-glycyl-glycine (2.5. dikétopipérazine).

La cyclo-glycyl-glycine cristallise habituellement, de l'eau, en minces feuillets caractéristiques, libres ou groupés en dendrites, faciles à reconnaître au microscope.

Le traitement de la cyclo-glycyl-glycine par une solution chlorhydrique de chlorure de platine ne donne pas lieu, comme le croyait TH. CURTIUS, à la formation d'un chloroplatinate de glycinanhydride (cyclo-glycyl-glycine). L'acidité du réactif détermine l'ouverture du cycle, et le produit obtenu, identique à celui qu'avait décrit TH. CURTIUS, est en réalité le *chloroplatinate de glycyl-glycine* $(\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH})^2 \text{PtCl}_4, 2\text{H}_2\text{O}$.

Parmi les propriétés de la *glycyl-glycine* $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH}$ qui résulte de l'ouverture de la molécule de cyclo-glycyl-glycine, je signalerai comme nouvelle la condensation spontanée, en milieu aqueux, de la glycyl glycine en *triglycyl-glycine* $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH}$. Cette condensation très intéressante, qui au point de vue quantitatif ne se fait que dans une proportion restreinte, est cependant facile à mettre en évidence par la belle réaction du biuret que donne la triglycyl-glycine.

Par addition d'acide chloroplatinique et concentration, la glycyl-glycine fournit, en très beaux cristaux, le *chloroplatinate de glycyl-glycine* $(\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH})^2 \text{PtCl}_4, 2\text{H}_2\text{O}$, pour la première fois préparé et analysé. Ce sel perd dès 110° ses deux molécules d'eau de cristallisation. Je l'ai reconnu identique au chloroplatinate que TH. CURTIUS avait obtenu à partir du glycinanhydride (cyclo-glycyl-glycine) et qu'il avait interprété à tort comme chloroplatinate de glycinanhydride.

L'aspect microscopique d'une cristallisation de glycyl-glycine est une indication utile lorsque la glycyl-glycine est pure, mais on ne saurait compter sur elle dans le cas de mélanges complexes.

La cristallisation du glycyl-glycinate de cuivre n'est ni assez facile, ni assez caractéristique, pour qu'on puisse y recourir dans la recherche microscopique.

Les réactifs acides donnent avec la glycyl-glycine des cristallisa-

tions dont certaines (chloroplatinate, silicoduodécitungstate) pourraient être caractéristiques même en présence d'une grande quantité de substances étrangères. Malheureusement ces réactifs ne sont pas utilisables en présence de la cyclo-glycyl-glycine, parce qu'ils hydratent ce dernier corps, et fournissent alors des dérivés de la glycyl-glycine sans que celle-ci soit réellement présente à l'origine

Il ne m'a pas été possible de déceler la glycyl-glycine dans les premiers produits de condensation du glyocolle au sein de la glycérine. En raison des difficultés de la recherche, je n'oserais affirmer qu'elle en soit rigoureusement absente; mais je crois pouvoir penser qu'elle n'y existerait, en tous cas, qu'en proportion très minime sinon nulle.

Le glyocolle maintenu à 170° en présence d'un excès de glycérine donne naissance, outre la cyclo-glycyl-glycine, à une *substance biurétique soluble* dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool. Il faut éviter de la laisser séjourner en solution aqueuse chaude en présence de la cyclo-glycyl-glycine, car elle disparaît dans ces conditions, en même temps que prend naissance une autre substance biurétique, caractérisée par son insolubilité dans l'eau même bouillante. La substance biurétique soluble peut être obtenue à l'état pur, en éliminant, par une série de lavages à l'alcool à 80° chaud, la cyclo-glycyl-glycine qui l'accompagne.

L'hydrolyse, transformant intégralement en glyocolle la substance biurétique soluble, montre que la molécule de celle-ci est une chaîne de glycyloxydes. La faculté de dissoudre l'oxyde cuivrique précipité montre que la chaîne de glycyloxydes a ses extrémités libres. En calculant la composition centésimale des enchaînements polyglycyls (à extrémités libres) de rang croissant, on voit que les chiffres d'analyse de la substance biurétique soluble concordent exactement avec le polypeptide de rang 4, la *triglycyl-glycine* $\text{NH}_2\text{.CH}_2\text{.CO—NH.CH}_2\text{.CO—NH.CH}_2\text{.CO—NH.CH}_2\text{.COOH}$. La constitution de celle-ci est donc déterminée intrinsèquement, et en dehors de toute comparaison bibliographique.

La méthode de Dumas donne des chiffres d'azote un peu trop faibles dans l'analyse de la triglycyl-glycine, à cause de la résistance de celle-ci à la combustion et de son absence de volatilité.

Après que les caractères intrinsèques de la substance biurétique soluble l'ont fait reconnaître comme la triglycyl-glycine, la comparaison de ses propriétés avec celles de la triglycyl-glycine de E. FISCHER montre une concordance parfaite

Le chauffage rapide de la substance biurétique soluble au sein de l'alcool absolu saturé d'acide chlorhydrique, la transforme en un corps bien cristallisé, donnant une magnifique réaction du biuret, fondant à 196°-196°5 corr., et dont les analyses concordent avec la formule du *chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle* $\text{HCl} \cdot \text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOC}^2\text{H}^5$.

Les propriétés du chlorhydrate concordent exactement avec celles d'un échantillon du chlorhydrate de la « base biurétique » de TH. CURTIUS, préparé en suivant les indications de cet auteur, et qui est reconnu (TH. CURTIUS, E. FISCHER) comme étant précisément le chlorhydrate de triglycyl-glycinate d'éthyle.

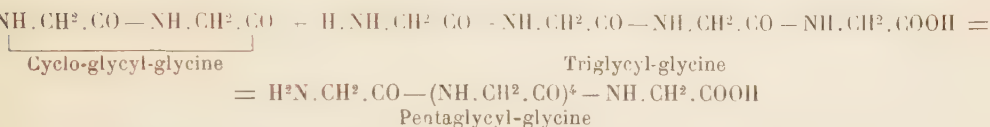
Lorsque la substance biurétique soluble (triglycyl-glycine) séjourne en solution aqueuse chaude contenant de la cyclo-glycyl-glycine, on voit apparaître, au sein de la solution limpide, des flocons insolubles dans l'eau même bouillante. Les flocons se dissolvent dans l'ammoniaque étendue chaude, et donnent alors une magnifique réaction du biuret. La *substance biurétique insoluble* dans l'eau, mise en solution ammoniacale, est précipitée par expulsion de l'ammoniaque au bain-marie, ou par neutralisation acétique.

La solubilité dans les alcalis étendus donne à penser que la molécule de la substance biurétique insoluble est une chaîne polyglycylique à extrémités libres. Les chiffres d'analyse concordent très bien avec la composition de la *pentaglycyl-glycine* $\text{NH}^2 \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO} - (\text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{CO})^4 - \text{NH} \cdot \text{CH}^2 \cdot \text{COOH}$. La constitution de la substance biurétique insoluble est donc déterminée par ses caractères intrinsèques, et indépendamment de toute comparaison bibliographique.

La méthode de Dumas donne des chiffres d'azote un peu trop faibles dans l'analyse de la pentaglycyl-glycine, à cause de la résistance de celle-ci à la combustion et de son absence de volatilité.

Après que les caractères intrinsèques de la substance biurétique insoluble l'ont fait reconnaître comme la pentaglycyl-glycine, la comparaison de ses propriétés avec celles de la pentaglycyl-glycine de E. FISCHER révèle une concordance parfaite.

La formation d'un hexapeptide linéaire, la pentaglycyl-glycine, à partir d'un tétrapeptide linéaire, la triglycyl-glycine, et en présence d'un dipeptide cyclique, la cyclo-glycyl-glycine, peut s'expliquer par l'addition molécule à molécule des deux corps :



Toutefois les conditions et les circonstances du phénomène ne sont pas encore complètement élucidées.

Outre la cyclo-glycyl-glycine et la triglycyl-glycine, le chauffage du glyocolle au sein de la glycérine à 170° fournit encore un autre produit de condensation, substance insoluble dans l'eau bouillante, dans les alcalis et les acides étendus et chauds, dans les dissolvants organiques, substance infusible, non volatile, très résistante aux réactifs. Cette substance est identique à l'anhydride « corné » de L. BALBIANO et D. TRASCIATTI.

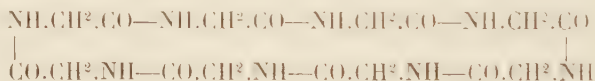
La substance résistante se dissout à froid dans les acides minéraux *concentrés* (chlorhydrique, sulfurique, nitrique), et se précipite inaltérée par dilution aqueuse de ces solutions acides. La dissolution dans l'acide *chlorhydrique* concentré, suivie de la précipitation par un excès d'eau, est particulièrement commode pour la purification de la substance.

L'analyse centésimale donne des chiffres qui concordent, soit avec une molécule formée d'un nombre quelconque de groupements glycyloxy unis en *chaîne fermée* $(-\text{NHCH}_2\text{CO}-)^n$, soit avec une *chaîne ouverte* de glycyloxy qui devraient être au nombre de 16 au moins et probablement davantage $\text{H}^2\text{NCH}_2\text{CO}-(\text{NHCH}_2\text{CO})^n \xrightarrow{\geq 16} \text{NHCH}_2\text{COOH}$. Pour des termes aussi élevés, les compositions centésimales respectives se rap-

prochent à un tel point que l'analyse ne peut plus permettre de décider entre les termes successifs.

Le fait que le corps ne peut se combiner aux acides ou alcalis étendus paraît peu compatible avec l'hypothèse d'une chaîne ouverte terminée par des groupes aminogène et carboxyle libres. La dissolution dans les acides minéraux *concentrés* peut s'expliquer par la salification, instable en présence d'un excès d'eau, des chaînons de liaison ($-\text{NH}-$), ainsi que la chimie organique en connaît bien des exemples. L'hypothèse d'une *chaîne fermée* est donc la plus vraisemblable, et le corps serait une *cyclo-polyglycyl-glycine*.

La cyclo-polyglycyl-glycine prend naissance dans les phases tardives de la condensation du glyocolle, et à mesure que disparaît la triglycyl-glycine d'abord formée : elle dérive de cette dernière, et sa molécule est donc formée de *4n* groupements glycyliques. La fermeture d'une molécule de triglycyl-glycine sur elle-même donnerait la cyclo-triglycyl-glycine ; mais le mécanisme habituel des condensations dans la série, ainsi que les propriétés physiques du corps, rendent vraisemblable une condensation plus élevée, associant deux molécules de triglycyl-glycine. Le corps est probablement l'octopeptide cyclique, la *cyclo-heptaglycyl-glycine* :



Le chauffage du glyocolle au sein de la glycérine produit encore, à côté des polypeptides, des matières colorantes, probablement au nombre de deux. L'une, peu abondante, soluble dans l'alcool comme dans l'eau, est de couleur orangée, avec forte fluorescence verte. L'autre, très abondante, soluble dans l'eau mais insoluble dans l'alcool, est brune, peu ou pas fluorescente.

La matière brune est une substance *azotée*, qui prend naissance, non pas directement à partir du glyocolle, mais *aux dépens de la cyclo-glycyl-glycine*.

La formation de la matière brune à partir de la cyclo-glycyl-glycine

ne résulte pas d'une oxydation, car elle se poursuit, au sein d'une atmosphère d'azote ou d'hydrogène purs, de la même façon qu'en présence de l'oxygène. Elle résulte peut-être d'une déshydratation.

La matière brune, de nature basique, précipite par certains réactifs des alcaloïdes : elle donne un précipité très important par le réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium), énorme par les acides phosphotungstique et silicoduoécitungstique.

La concordance et la succession dans le temps de toutes les réactions qui viennent d'être décrites, ont été établies en soumettant, à la température 175° , simultanément 25 mélanges identiques de glyocolle et de glycérine, qui étaient soustraits un à un, de demi-heure en demi-heure, au chauffage, et dans lesquels on déterminait l'intensité de la coloration brune, l'intensité de la réaction biurétique, les quantités de glyocolle resté libre, transformé en anhydrides, transformé en d'autres corps, disparu. Cette série expérimentale, dont les résultats se traduisent en courbes très nettes, a permis les constatations suivantes :

Pendant les premiers temps de séjour à 175° (période où se volatilise l'eau de dissolution) il ne se produit aucune condensation ni altération du glyocolle.

Après 1 heure $1/2$ ou 2 heures de séjour à 175° , le glyocolle libre commence à disparaître par condensation, en formant exclusivement des anhydrides, et sans subir ni transformations d'un autre genre, ni pertes. Le mélange de réaction ne prend encore qu'une coloration insignifiante. Cette période d'anhydrisation simple, partielle et lente, se poursuit jusqu'au bout de la 5^e heure : le glyocolle libre est alors tombé à 65 0/0 de la quantité primitive, et les 35 0/0 manquant se retrouvent tout entiers à l'état d'anhydrides hydrolysables.

Dès cette première période on constate que les processus de condensation se poursuivent simultanément par deux voies différentes. L'un donne naissance immédiatement à un corps cyclisé par anhydrisation totale, un cyclodipeptide, la cyclo-glycyl-glycine. L'autre processus fournit un corps à chaîne plus longue mais non fermée, un tétrapeptide linéaire, la triglycyl-glycine.

Après la 5^e heure, alors que la disparition de l'eau de dissolution paraît complète, la proportion du glyocolle resté libre baisse brusquement, jusqu'à tomber en une demi-heure de 65 0/0 à 17 0/0 de la

quantité primitive. Puis le glyocolle achève de se condenser : après 6 heures 1/2 sa disparition est presque totale; au bout de la 7^e heure on n'en trouve plus trace.

Au moment même où se produit la chute brusque du glyocolle, se développe aussi brusquement la coloration brune, et les deux courbes du glyocolle total et de l'azote total s'écartent brusquement, révélant ainsi l'apparition d'un dérivé azoté autre que les anhydrides du glyocolle : c'est la matière brune, azotée, dérivant de la cyclo-glycyl-glycine.

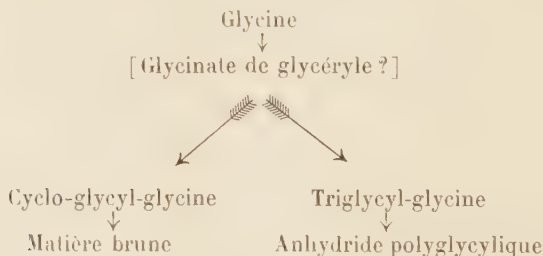
Pendant tout le temps que le mélange contient encore du glyocolle libre, la triglycyl-glycine ne cesse d'augmenter; son accroissement s'arrête aussitôt que le glyocolle a complètement disparu. La triglycyl-glycine dérive donc du glyocolle, mais non de la cyclo-glycyl-glycine.

Au moment même où les dernières traces de glyocolle ont disparu, la triglycyl-glycine diminue brusquement, n'étant plus protégée contre l'anhydridisation par le glyocolle lui-même, et demeurant le seul corps anhydridisable du mélange.

Pendant que disparaît la triglycyl-glycine, apparaissent les granulations insolubles de l'anhydride « corné », cyclo-polyglycyl-glycine qui résulte de l'anhydridisation de la triglycyl-glycine.

Lorsque le mélange glycériné est devenu très riche en cyclo-glycyl-glycine, il perd de l'azote, ce qui est dû à la volatilisation dans l'atmosphère d'une partie de cette cyclo-glycyl-glycine.

Les phénomènes de condensation du glyocolle au sein de la glycérine se groupent en deux séries d'importance quantitative inégale, qui se poursuivent indépendamment l'une de l'autre. Ces deux séries pourraient avoir comme stade précurseur commun la formation d'un éther glycérique du glyocolle. On peut les résumer dans le schéma suivant :



L'importance relative des deux séries de condensations est influencée d'une manière remarquable par la *proportion de glycérine* mise en présence du glyocolle. Avec 5-6 parties de glycérine pour 1 partie de glyocolle, la cyclo-glycyl-glycine se forme en quantité tout à fait prépondérante, et la triglycyl-glycine en quantité très faible. A mesure que la proportion de glycérine diminue, la série de la triglycyl-glycine augmente en importance ; elle peut arriver à égaler celle de la cyclo-glycyl-glycine si l'on emploie environ poids égaux de glyocolle et de glycérine, et même à la dépasser.

Toutes les observations recueillies au cours du travail s'expliquent à merveille et dans leurs plus minimes détails, si l'on admet que les phénomènes de condensation débutent par une éthérification glycérique des aminoacides, c'est-à-dire par la formation d'un *glycinate de glycéryle*, que celui-ci soit d'ailleurs un mono-, un di-, ou un triglycéride.

La condensation de 2 molécules de glycinate de glycéryle, avec régénération de 2 molécules de glycérine, donnerait la *cyclo-glycyl-glycine*. La condensation de 4 molécules de glycinate de glycéryle, avec régénération de 3 molécules de glycérine, donnerait un triglycyl-glycinate de glycéryle, fournissant par saponification ultérieure la *triglycyl-glycine* elle-même. La condensation de 2 molécules de triglycyl-glycinate de glycéryle, avec régénération de 2 molécules de glycérine, fournirait la *cyclo-heptaglycyl-glycine*. La saponification de 1 molécule de triglycyl-glycinate de glycéryle par 1 molécule d'eau, en présence de 1 molécule de cyclo-glycyl-glycine, donnerait 1 molécule de *pentaglycyl-glycine* avec régénération de 1 molécule de glycérine.

Bien qu'aucun triglycyl-glycinate de glycéryle n'ait été isolé jusqu'ici, certains indices permettent de soupçonner sa présence réelle parmi les produits de condensation du glyocolle.

Il est possible que la production de la cyclo-glycyl-glycine (cas d'un large excès de glycérine) résulte de la formation préalable d'un mono-glycéride ; et que la production de la triglycyl-glycine (cas d'une petite proportion de glycérine) résulte de la formation préalable d'un diglycéride.

Ma réaction de condensation par la glycérine (propanetriol, m'apparaît donc comme une généralisation de la réaction de TH. CURTIUS, qui est relative aux éthers éthyliques et méthyliques des acides aminés. *La propriété peptidogène est une propriété de la fonction alcool*, qui doit se retrouver chez divers corps à fonction alcoolique convenablement choisis.

La nouvelle synthèse peptidogène présente un *intérêt biologique considérable*, car pour la première fois elle réalise l'enchaînement des aminoacides sans mettre en jeu d'autres substances que celles mêmes dont dispose l'organisme, dans l'assimilation intestinale par exemple : acides aminés *libres*, et glycérine.

Ma méthode est très différente à ce point de vue des remarquables synthèses de E. FISCHER, qui ne peuvent être comparées aux phénomènes biologiques, parce qu'elles ne construisent que fragmentairement les molécules aminoacides à l'extrémité de la chaîne, et en faisant intervenir des réactifs non biologiques : alcool absolu, gaz chlorhydrique, brome, chlorure de thionyle, ammoniacque concentrée.

Rien n'empêche de comparer le mécanisme de la nouvelle synthèse avec celui de la synthèse protéique naturelle, de l'assimilation intestinale par exemple, et cela bien qu'elle ait lieu à haute température et en milieu déshydraté. De même que la synthèse des graisses, qui ne se fait *in vitro* qu'à haute température et en milieu peu hydraté, réussit chez les êtres vivants à température basse et en milieu aqueux ; de même l'éthérification glycérique des aminoacides, point de départ de la synthèse peptidogène, peut avoir lieu dans les mêmes conditions, par le jeu du même système biologique. Si l'intestin par exemple possède (et cela est), un système lipothétique ayant pour fonction d'éthérifier le propanetriol par des carboxyles, *il suffit de ce seul et même système pour réaliser à la fois la synthèse des graisses et celle des albuminoïdes, selon qu'il emprunte les carboxyles aux acides gras ou aux acides aminés.*

L'ensemble de mes travaux m'amène à formuler une *théorie chimique de la protéogénèse naturelle* : ce phénomène consiste d'abord en une éthérification glycérique des acides aminés, éthérification tout à fait superposable, biologiquement comme chimiquement, à l'éthérification des acides simples qui donne les graisses ; puis la rupture des glyc-

rides instables enchaîne les tronçons des aminoacides, tandis que la glycérine régénérée peut servir à de nouvelles synthèses albuminoïdes ou se fixer dans la synthèse des graisses.

Parmi les nombreux corollaires physiologiques que peut prévoir ma théorie et qui permettront de la contrôler, citons la *nécessité de la glycérine (c'est-à-dire en pratique des graisses alimentaires) pour l'utilisation intestinale des albuminoïdes*. Le contrôle expérimental de ce corollaire est dès à présent fourni, de la manière la plus nette, par les recherches physiologiques de F. Maignon, contemporaines de mes travaux et complètement indépendantes.

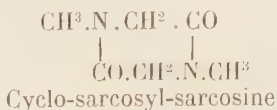
Comme autre corollaire *prévu* par ma théorie, on peut encore citer la *superposition des figures cytologiques observées dans les cellules de l'épithélium intestinal lors de l'absorption des graisses et des albuminoïdes*. Ces figures doivent être très comparables entre elles, au moins au stade de début, pour les deux groupes de substances; les sucres doivent se classer à part. Ces prévisions se trouvent dès maintenant vérifiées par les recherches microscopiques de C. Champy, contemporaines de mes travaux et complètement indépendantes.

DEUXIÈME PARTIE

Action de la glycérine sur les homologues du glycocolle, isolés (Synthèse des cyclo-glycyl-glycines homogènes)

La *sarcosine*, maintenue à 170° en présence d'un excès de glycérine, disparaît entièrement, et la très majeure partie se transforme par voie d'anhydridisation.

Le produit fondamental est la *cyclo-sarcosyl-sarcosine* $C^6H^{10}N^2O^2$, déterminée par l'analyse centésimale et la cryoscopie : beaux cristaux incolores et transparents, de saveur amère, fondant à 150°, extrêmement solubles dans l'eau et dans l'alcool, légèrement solubles dans l'éther (ce qui permet de l'extraire du sein de la glycérine) :



Les produits de chauffage de la sarcosine au sein de la glycérine contiennent une petite quantité d'un alcaloïde à odeur pyridique, peut-être dérivé du noyau pyrazique, et qui disparaît au contact de l'éther en même temps qu'apparaît une substance volatile à odeur de noyau.

Les produits de chauffage de la sarcosine au sein de la glycérine n'ont fourni jusqu'ici aucun polypeptide supérieur.

Le chauffage de la sarcosine au sein de la glycérine ne détermine pas la production d'une quantité pondérable de matière brune.

Le chauffage de la sarcosine au sein de la glycérine s'accompagne de la décomposition d'une petite partie de la substance en diméthylamine et anhydride carbonique.

La cyclo-sarcosyl-sarcosine est identique à l'anhydride de sarcosine obtenu par F. MYLIUS en fondant la sarcosine vers 220°.

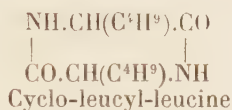
Le prétendu « chloroplatinate de sarcosinanhydride » préparé par F. MYLIUS et formulé par lui $2(C^6H^{10}N^2O^2.HCl).PtCl^4 + 2H^2O$ (cristallisé dans l'alcool), ou $2(C^6H^{10}N^2O^2.HCl).PtCl^4 + 4H^2O$ (cristallisé dans l'eau), doit être en réalité le *chloroplatinate de sarcosyl-sarcosine* $[HCl.NH(CH^3).CH^2.CO - N(CH^3).CH^2.COOH]^2PtCl^4$ (cristallisé dans l'alcool), ou $[HCl.NH(CH^3).CH^2.CO - N(CH^3).CH^2.COOH]^2PtCl^4 + 2H^2O$ (cristallisé dans l'eau), dérivant de la *sarcosyl-sarcosine* $HN(CH^3).CH^2.CO - N(CH^3).CH^2.COOH$ qui se forme par l'ouverture de la cyclo-sarcosyl-sarcosine sous l'action du réactif chloroplatinique acide.

L'anhydride obtenu par J. TRAUBE en faisant passer du chlorure de cyanogène sur la sarcosine fondue, devait être lui aussi la cyclo-sarcosyl-sarcosine ; mais comme J. TRAUBE ne l'avait analysé qu'à l'état de chloroplatinate, on conçoit qu'il soit retombé sur le chloroplatinate de sarcosyl-sarcosine, et qu'il ait faussement attribué à l'anhydride primitif la formule $C^6H^{12}N^2O^3$ qui est celle de la *sarcosyl-sarcosine* non cyclisée. L'ouverture de la cyclo-sarcosyl-sarcosine par les réactifs acides explique les contradictions apparentes de la littérature.

La *d.L.leucine*, maintenue à 170° en présence d'un excès de glycérine, disparaît entièrement, bien qu'avec une certaine lenteur due à

son peu de solubilité, et la très majeure partie se transforme par voie d'anhydrisation.

Le produit fondamental est une *cyclo-leucyl-leucine* $C^{12}H^{22}N^2O^2$, déterminée par l'analyse centésimale : fines aiguilles blanches à éclat soyeux, fondant à 271° corr., sublimables sous forme de gros flocons lanugineux, presque insolubles dans l'eau ainsi que dans les acides et alcalis dilués, solubles dans l'alcool bouillant d'où elles cristallisent par refroidissement, insolubles dans l'éther, solubles dans l'acide sulfurique concentré, d'où la substance précipite inaltérée par dilution aqueuse :



Pendant le chauffage de la d.l leucine en présence de glycérine, on observe le dégagement d'une odeur très caractéristique de *cacao torréfié* : c'est un cas particulier du phénomène général par lequel on obtient, en chauffant des acides aminés avec la glycérine, les odeurs caractéristiques de diverses graines oléagineuses torréfiées. Je considère cette réaction comme identique à celle qui se passe dans la torréfaction des graines ; les produits aromatiques (glycérides des amino-acides ? n'ont pas encore été isolés.

Pendant le chauffage de la d.l.leucine en présence de la glycérine, se forme aussi en petite quantité une base à odeur vireuse, différente de l'isoamylamine, plus soluble dans l'éther que dans l'eau, donnant des sels plus solubles dans l'eau que dans l'éther, précipitable par la plupart des réactifs des alcaloïdes, et qui est peut-être une *base de la série pyrazique ou hydroyprazique*, formée par déshydratation directe de la cyclo-leucyl-leucine.

Les produits du chauffage de la d.l.leucine au sein de la glycérine n'ont fourni jusqu'ici aucun polypeptide supérieur.

Le chauffage de la d.l.leucine au sein de la glycérine ne détermine pas la formation d'une quantité pondérable de matière brune.

La nomenclature que je préconise prévoit trois variétés de cyclo-leucyl-leucines : (I) la *cyclo-l.leucyl-d.leucine*, identique à la cyclo-d.leucyl-l leucine, inactive sur la lumière polarisée ; (II) la *cyclo-d.leucyl-d.leucine*, optiquement active ; (III) la *cyclo-l.leucyl-l.leucine*, antipode

de la précédente; auxquelles il faut ajouter en pratique : (IV) le *racémique* formé par la paire des antipodes précédents [Cyclo-d.leucyl-d.leucine + Cyclo-l.leucyl-l.leucine].

Une revision critique très minutieuse de la littérature depuis les origines permet d'arriver aux conclusions catégoriques suivantes :

La *cyclo-l.leucyl-d.leucine*, F. 287-289°, est identique au trans-leucin-anhydride de E. FISCHER et A. H. KOELKER (1907).

La *cyclo d.leucyl-d.leucine*, identique au d.leucin-anhydride de E. FISCHER et A. H. KOELKER (1907), si elle fond à la même température que son antipode, doit avoir pour point de fusion F. 295°-296°, bien que ces auteurs aient trouvé un point voisin de 277°, trop bas, de leur propre aveu, pour cause d'impureté.

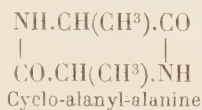
La *cyclo-l.leucyl-l.leucine*, F. 295°-296°, comprend tous les échantillons naturels de « leucinimide » rencontrés dans le fractionnement des produits d'hydrolyse des albuminoïdes, par F. BOPP (1849), E. ERLENMEYER et A. SCHÖFFER (1859), O. HESSE et H. LIMPRICHT (1860), E. ERLENMEYER (1861), J. L. W. THUDICHUM (1879), H. HLASIWETZ et J. HABERMANN (1871), H. RITTHAUSEN (1872, 1896), R. COHN (1896, 1900), S. SALASKIN (1901), S. SALASKIN et K. KOWALEVSKY (1903), E. ABDERHALDEN (1903, 1906). A mon avis l'apparition de cette leucinimide parmi les produits d'hydrolyse traduit la préexistence de couples (-l.leucyl-l.leucyl-) tout préformés dans la molécule protéique hydrolysée. La *cyclo-l.leucyl-l.leucine* doit être identique au l.leucin-anhydride de E. FISCHER (1906), bien que cet auteur ait donné le point de fusion 277°, trop bas pour cause d'impureté.

Le *racémique* formé par la paire d'antipodes [Cyclo-d.leucyl-d.leucine + Cyclo-l.leucyl-l.leucine], F. 271°, comprend tous les échantillons de « leucinimide » synthétique, obtenus avec diverses techniques par O. HESSE (1857), A. KOHLER (1865), J. L. W. THUDICHUM (1870), A. DESTREM (1878), R. COHN (1900), E. FISCHER (1901, 1902, 1904), S. SALASKIN (1901), L. BOUVEAULT et R. LOCQUIN (1904), L. C. MAILLARD (1911).

La *cyclo-leucyl-leucine* F. 271°, que j'ai obtenue dans les recherches actuelles, par chauffage de la d.l.leucine au sein de la glycérine, doit être considérée comme le *racémique* formé par la paire d'antipodes [Cyclo-d.leucyl-d.leucine + Cyclo-l.leucyl-l.leucine].

L'alanine, maintenue à 170° en présence d'un excès de glycérine, disparaît entièrement et facilement, la très majeure partie se transformant par voie d'anhydrisation.

Le produit fondamental est une *cyclo-alanyl-alanine* $C^6H^{10}N^2O^2$, déterminée par l'analyse centésimale : aiguilles blanches fines ou trapues suivant la vitesse de la cristallisation, F. 282°-282°5, un peu solubles dans l'eau froide, davantage à chaud, facilement solubles dans l'alcool surtout à chaud, de saveur légèrement amère :



Le chauffage de l'alanine au sein de la glycérine est, non seulement un mode de formation, mais encore *le meilleur procédé de préparation pratique de la cyclo-alanyl-alanine* (racémique).

Pendant le chauffage de l'alanine en présence de glycérine, on perçoit une odeur très nette de *noisette grillée*, cas particulier du phénomène général déjà signalé à propos de la leucine, et par lequel le chauffage des acides aminés avec la glycérine reproduit les substances odorantes caractéristiques de la torréfaction des graines oléagineuses.

Pendant le chauffage de l'alanine au sein de la glycérine se forme encore, en petite quantité, une base à odeur spéciale, différente de l'éthylamine, plus soluble dans l'éther que dans l'eau, donnant des sels plus solubles dans l'eau que dans l'éther, précipitable par la plupart des réactifs des alcaloïdes. Il s'agit peut-être d'une *base de la série pyrazique ou hydrompyrazique*, formée par déshydratation directe de la cyclo-alanyl-alanine.

Les produits du chauffage de l'alanine au sein de la glycérine n'ont fourni jusqu'ici aucun polypeptide supérieur.

Le chauffage de l'alanine au sein de la glycérine ne détermine pas la formation d'une quantité pondérable de matière brune.

La nomenclature que je préconise prévoit trois variétés de cyclo-alanyl-alanines : (I) la *cyclo-l.alanyl-d.alanine*, identique à la cyclo-d.alanyl-l.alanine, inactive sur la lumière polarisée ; (II) la *cyclo-d.alanyl-d.alanine*, optiquement active ; (III) la *cyclo-l.alanyl-l.alanine*,

antipode de la précédente; auxquelles il faut ajouter en pratique : (IV) le *racémique* formé par la paire des antipodes précédents [Cyclo-d.alanyl-d.alanine + Cyclo-l.alanyl-l.alanine].

La revision critique de la littérature permet de conclure qu'à l'heure actuelle on connaît deux de ces quatre variétés :

La *cyclo-d.alanyl-d.alanine*, F. 297°, préparée synthétiquement par E. FISCHER (1906).

La *paire racémique* [Cyclo-d.alanyl-d.alanine + Cyclo-l.alanyl-l.alanine], F. 282°-282°5, à laquelle se rapportent les échantillons de J. PREU (1865), E. FISCHER (1901, 1906), L. C. MAILLARD (1911).

La cyclo-alanyl-alanine F. 282°-282°5 que j'ai obtenue dans les recherches actuelles, par chauffage de la d.alanine au sein de la glycérine, doit être considérée comme le *racémique* formé par la paire d'antipodes [Cyclo-d.alanyl-d.alanine + Cyclo-l.alanyl-l.alanine].

TROISIÈME PARTIE

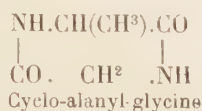
Action de la glycérine sur les homologues du glycocolle, en mélange. (Synthèse des cyclo-glycyl-glycines mixtes.)

Lorsque les acides α -aminés sont maintenus à 170° en présence de la glycérine, non plus isolément, mais en mélanges d'espèces différentes, ils présentent une tendance remarquable à s'enchaîner mutuellement en anhydrides *mixtes*, au lieu de s'anhydriser isolément chacun pour son propre compte.

Un mélange équimoléculaire d'*alanine* et *glycine*, maintenu à 170° en présence d'un excès de glycérine, se transforme presque intégralement en un cyclodipeptide mixte, qu'il est facile d'amener à cristallisation en additionnant d'éther la solution alcoolique du produit chauffé.

Le produit fondamental de la condensation est une *cyclo-alanyl-gly-*

cine $C^5H^8N^2O^2$, déterminée par l'analyse centésimale. Fines aiguilles blanches, fondant nettement à 229° corr., solubles assez facilement dans l'eau, très facilement dans l'alcool chaud, d'où la substance cristallise par refroidissement :



A côté de ce produit fondamental se forme un peu de cyclo-glycyl-glycine (2.5.diacipipérazine), ainsi que du corps à odeur de noisette grillée dérivant de l'alanine, et de l'alkaloïde de même origine. Mais ces substances sont tout à fait secondaires en quantité. Il ne se produit ni corps biurétique, ni matière colorante en quantité digne d'être notée.

Lorsque la cyclo-alanyl-glycine est accompagnée d'un peu de cyclo-glycyl-glycine, elle ne présente plus le point de fusion net à 229° corr. : elle noircit avant de fondre et se ramollit par échelons entre 230° et 260° , sans qu'il soit possible d'adopter un point déterminé entre ces limites. Il est à remarquer qu'une allure du même genre était présentée par les anhydrides mixtes de E. FISCHER et E. OTTO (1903), E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (1906), E. FISCHER et A. SCHULZE (1907).

Ma nomenclature prévoit l'existence de deux antipodes optiques : (I) la *cyclo-d.alanyl-glycine*, et (II) la *cyclo-l.alanyl-glycine*, auxquels il faut ajouter en pratique : (III) le *racémique* formé par leur union.

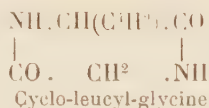
Le *racémique* a été obtenu synthétiquement par E. FISCHER et E. OTTO (1903). La *cyclo-d.alanyl-glycine*, rencontrée par E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (1906) au cours de leurs études sur l'hydrolyse de la soie (où elle préexiste probablement sous forme de glycyl-d.alanine), a été préparée synthétiquement par E. FISCHER et A. SCHULZE (1907) : $[\alpha]_D^{20} = -5^{\circ}$.

L'absence de point de fusion net dans les données des auteurs précédents empêche la comparaison avec la variété obtenue dans mes propres recherches. Etant donnée sa formation à haute température, et par analogie avec ce qui se passe dans les cas de la leucine isolée et de l'alanine isolée, il est plausible de la considérer comme la cyclo-alanyl-glycine *racémique*.

Un mélange de *d.l.leucine* et *glycine*, maintenu à 470° en présence d'un excès de glycérine, se transforme intégralement en cyclodipeptides, qu'il est facile d'amener à cristallisation en additionnant d'éther la solution alcoolique du produit chauffé.

Même dans le cas d'un mélange préparé équimoléculaire, il se forme toujours de la cyclo-glycyl-glycine par réaction de glycocole sur glycocole, car, par suite de la différence des solubilités, la glycérine chaude contient toujours en solution un large excès de glycine par rapport à la *d.l.leucine*. Pour obtenir un rendement convenable en dérivé mixte, il est d'ailleurs bon d'employer volontairement le glycocole en excès par rapport à la *d.l.leucine*.

Le produit caractéristique de la condensation est une *cyclo-leucyl-glycine*, que l'on sépare de la cyclo-glycyl-glycine en fractionnant au moyen de l'alcool chaud, où le dérivé mixte est le plus facilement soluble. Séparée autant que possible de la cyclo-glycyl-glycine, la cyclo-leucyl-glycine $C^8H^{14}N^2O^2$ donne à l'analyse des chiffres satisfaisants. Elle est soluble très facilement dans l'alcool chaud, ainsi que dans l'eau d'où elle cristallise, par évaporation lente, en druses à structure radiée. Les échantillons fondent vers 236° corr., sans qu'il soit possible de faire une détermination précise :



Outre la cyclo-leucyl-glycine et la cyclo-glycyl-glycine, on constate la formation d'un peu du corps à odeur de cacao torréfié dérivant de la leucine, ainsi que de l'alkaloïde de même origine ; ces substances n'apparaissent d'ailleurs qu'en quantité tout à fait secondaire. Il ne se produit que des traces insignifiantes de substance biurétique, sans doute de triglycyl-glycine provenant de l'excès de glycocole. La petite quantité de matière brune qui se forme doit avoir la même origine.

Ma nomenclature prévoit l'existence de deux antipodes optiques : (I) la *cyclo-d.leucyl-glycine*, et (II) la *cyclo-l.leucyl-glycine*, auxquels il faut ajouter en pratique : (III) le *racémique* formé par leur union.

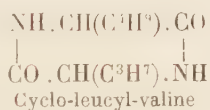
Le *racémique* a été obtenu synthétiquement par E. FISCHER (1905), A. BRUNNER (1905), O. WARBURG (1905) : il fond à 245° corr. La *cyclo-*

l.leucyl-glycine, rencontrée par E. FISCHER et E. ABDERHALDEN (1906) au cours de leurs recherches sur l'hydrolyse de l'élastine, a été préparée synthétiquement par E. FISCHER (1906) : elle fond à 254°-255° corr. La *cyclo-d.leucyl-glycine* n'est pas décrite jusqu'à présent.

L'impossibilité de déterminer nettement le point de fusion de mes échantillons, toujours souillés d'un peu de cyclo-glycyl-glycine, empêche la comparaison. Il est évident toutefois que ces échantillons préparés à partir de leucine racémique, ne peuvent être eux-mêmes que le *racémique*.

Lorsqu'on maintient à 170°, en présence d'un excès de glycérine, un mélange de *leucine et valine* (échantillons de valine protéique accompagnée d'une proportion plus ou moins forte de leucine), la leucine s'unit à la valine pour former un cyclodipeptide *mixte*.

Le produit caractéristique de cette réaction est une *cyclo-leucyl-valine* $C^{14}H^{20}N^2O^2$, déterminée par l'analyse. Longues aiguilles soyeuses F. 260° corr., pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'alcool bouillant d'où la substance cristallise par refroidissement, solubles dans l'acide sulfurique concentré d'où la substance précipite inaltérée par dilution aqueuse.



Par ses propriétés la cyclo-leucyl-valine se rapproche des cyclo-leucyl-leucines (leucinimides) à un tel point qu'on ne peut l'en distinguer que par l'analyse et le point de fusion, et qu'il doit être fort difficile de l'en séparer dans un mélange. Il est donc presque certain que des échantillons de leucinimide autrefois préparés (R. COHN, 1900) en anhydriant de la leucine protéique (laquelle contenait certainement de la valine) renfermaient de la cyclo-leucyl-valine. Cette remarque suffit à expliquer l'abaissement anormal du point de fusion et des chiffres d'analyse dans les observations de R. COHN.

Ma nomenclature prévoit quatre cyclo-leucyl-valines stéréoisomères,

toutes quatre optiquement actives, susceptibles de se grouper deux à deux pour constituer deux paires racémiques différentes :

A. — Paire racémique $\left\{ \begin{array}{l} \text{Cyclo-d.leucyl-d.valine.} \\ \text{Cyclo-l.leucyl-l.valine.} \end{array} \right.$

B. — Paire racémique $\left\{ \begin{array}{l} \text{Cyclo-l.leucyl-d.valine.} \\ \text{Cyclo-d.leucyl-l.valine.} \end{array} \right.$

On connaît déjà la *cyclo-l.leucyl-d.valine*, qui est le l.leucyl-d.valin-anhydride de E. FISCHER et H. SCHEIBLER (1908), lévogyre $[\alpha]_D^{25} = -50^{\circ}2$, fondant à 282° corr.

Ma cyclo-leucyl-valine fondant à 260° corr. est évidemment différente de la précédente. Etant donnée sa formation à haute température, et par analogie avec ce qui se passe dans le cas de la leucine isolée et de l'alanine isolée, il est plausible de la considérer comme *l'un des deux racémiques* prévus.

QUATRIÈME PARTIE

Action des sucres sur les acides α -aminés (Formation des matières humiques et mélanoidiques)

Malgré leurs fonctions alcooliques, les sucres ne se comportent pas, vis-à-vis des acides α -aminés, comme des agents de condensation peptidogène, comparables à la glycérine. La présence de la fonction aldéhydrique (ou cétonique) donne lieu à des phénomènes d'un ordre tout différent.

Un mélange de *glycocolle* avec un excès apparent de *d.glucose*, mis en solution aqueuse concentrée et porté à 100° , brunit au bout de quelques minutes, puis mousse par suite d'un abondant dégagement gazeux, et laisse comme résidu une masse amorphe, d'un brun noir, en grande partie insoluble dans l'eau.

La réaction, rapide à 100° , devient très violente à 130° , 140° , 150° .

A 40° , la réaction se poursuit encore normalement : il suffit de 60 heures environ pour parvenir au dégagement des bulles gazeuses.

La réaction se produit même à 34° ; le mélange ne commence guère à jaunir qu'après 48 heures, puis le brunissement s'accélère, le dégagement gazeux apparaît, et la réaction se poursuit pendant des semaines, même au voisinage de 0° .

Le gaz dégagé est CO^2 , qui pourrait provenir soit du carboxyle du glycolle, soit des autres atomes de carbone empruntant leur oxygène au sucre, soit de ces mêmes carbones empruntant leur oxygène à l'air.

La quantité de CO^2 produite, même dans un courant d'oxygène, ne dépasse pas celle que peut fournir la simple scission du carboxyle.

En espace clos, en présence d'un volume connu d'oxygène, la réaction paraît absorber une minime quantité d'oxygène, mais dégage un volume beaucoup plus considérable de CO^2 .

En espace clos, en présence d'un volume connu d'azote pur, la réaction n'absorbe pas de gaz, et dégage néanmoins une quantité considérable de CO^2 .

En espace clos, en présence d'un volume connu d'hydrogène pur, la réaction n'absorbe pas de gaz, et dégage néanmoins une quantité considérable de CO^2 .

En l'absence de toute atmosphère, la réaction dégage néanmoins une quantité considérable de CO^2 .

Toutes ces expériences démontrent que CO^2 dégagé n'emprunte pas son oxygène à l'air atmosphérique.

La formation des matières brunes se poursuit exactement de la même façon, soit en atmosphère d'oxygène, soit en atmosphère d'azote, soit en atmosphère d'hydrogène, soit en l'absence de toute atmosphère. Aucune oxydation n'intervient donc dans ce phénomène.

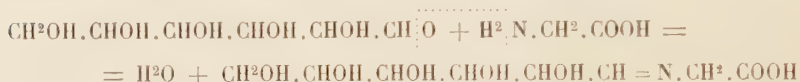
La mesure de CO^2 dégagé et l'analyse centésimale du résidu ont permis de dresser le bilan quantitatif de la réaction pour les quatre éléments en présence : carbone, hydrogène, oxygène, azote. La réaction consiste en la perte simultanée de CO^2 et H^2O dans le rapport de 12 molécules H^2O pour 1 molécule CO^2 .

Le gaz CO^2 dégagé ne peut donc emprunter son oxygène aux fonc-

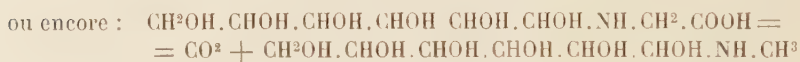
tions oxygénées du sucre, et n'a d'autre origine que le carboxyle de l'acide aminé.

La réaction primitive peut se concevoir comme une série de trois phénomènes :

a. — Condensation de la fonction aminée du glycolle avec la fonction aldéhydique du sucre :



b. — Rupture du carboxyle :



c. — Déshydratation enlevant des oxhydriles et des atomes d'hydrogène du glucose, créant des doubles liaisons et probablement des cycles moléculaires.

Le fait qu'à l'élimination de 1 molécule CO^2 correspond l'élimination de 12 molécules H^2O , prouve que *plusieurs* molécules de sucre (au moins trois) entrent en jeu pour 1 molécule d'acide aminé : si elles s'unissent dans une même molécule finale, celle-ci doit être un corps polycyclique à 1 atome d'azote, riche en carbone.

La *matière brune* qui se produit dans les premiers temps de la réaction *reste soluble dans l'eau*. Elle n'est précipitée ni par les acides, ni par les alcalis, ni par les sels neutres alcalins ou alcalino-terreux. Elle se fixe aisément sur la chaux, la baryte, la magnésie, et leurs carbonates, en formant des terres de teinte ocracée. Indépendamment des phénomènes possibles de saturation chimique, cette fixation résulte en tout ou en partie de phénomènes d'adsorption, car elle a lieu très aisément sur les précipités de sulfate de baryum et surtout de phosphate de calcium dont on provoque la formation au sein du liquide. Cependant la réaction chimique du milieu joue un rôle, car l'adsorption, très intense en réaction alcaline ou neutre, n'a plus lieu en réaction acide.

La matière brune soluble des premiers temps de la réaction ne tarde pas à donner naissance, au sein même de l'eau, à de la *matière brune insoluble dans l'eau* : celle-ci peut se former même à basse température, plus rapidement à 100°. La partie principale de la masse a une teneur en azote voisine de 4,35 0/0 (des fractions plus minimes ont donné 4,86 et même 5,48).

La fraction principale obtenue à partir du glucose et du glycolle présente la composition suivante : C = 58,85 0/0 — H = 4,92 0/0 — N = 4,35 0/0. S'il s'agissait d'une substance unique et définie dont on pût calculer la formule, on arriverait à l'expression $C^{16}H^{15}NO^6$. Ceci montre à nouveau l'entrée en réaction de 3 molécules de glucose pour 1 molécule de glycolle.

La matière brune insoluble dans l'eau, même chaude, et dans les acides étendus, cède à l'ammoniaque une certaine quantité de substance qui précipite partiellement par neutralisation. La potasse et la soude dissolvent instantanément une partie de la masse en un liquide brun foncé dont la neutralisation précipite des flocons bruns ; mais une partie de la masse brune est très résistante à l'action des alcalis.

L'attaque hydrolytique prolongée par l'acide sulfurique étendu bouillant ne régénère, à partir de la matière brune insoluble, aucune trace de glycolle. Cette attaque dissout en partie la matière, mais laisse un abondant résidu inattaquable, formé de *paillettes brillantes d'un noir de jais*, dont la teneur en azote est voisine de 4,86 0/0 ; l'acide sulfurique concentré dissout lentement, en un liquide noir, la nouvelle substance, qui précipite abondamment en flocons noirs lorsqu'on verse dans l'eau la solution sulfurique.

Un mélange de *d.glucose* avec un *excès de glycolle*, chauffé en solution aqueuse, montre essentiellement les mêmes phénomènes que dans le cas où c'est le sucre qui est en excès apparent. Le glucose est ici transformé tout entier en matières brunes, identiques par leurs propriétés aux précédentes. A cette formation de matière brune azotée prend part la quantité correspondante d'acide aminé : l'excès de glycolle est retrouvé inaltéré.

La formation de cyclo-glycyl-glycine, ou d'un autre anhydride quelconque du glycolle, n'a pu être mise en évidence. Le glucose ne possède donc, *dans ces conditions*, aucun pouvoir peptidogène : ceci se comprend aisément si l'on remarque que le glucose ne possède plus

d'oxydriles capables de servir à l'éthérification des acides aminés, et cela parce qu'il perd précocement ses oxydriles sous forme d'eau, en raison du phénomène de déshydratation intense qui accompagne la fixation de l'azote du glyocolle sur le glucose. L'échec de la condensation peptidogène dans ces conditions, loin de contredire ma théorie de la synthèse peptidogène par éthérification, est au contraire de nature à la corroborer.

La réaction qui vient d'être décrite à propos du glyocolle et du d.glucose, est une *réaction générale* de groupe, qui s'étend aux divers acides α -aminés d'une part, aux divers sucres réducteurs d'autre part.

L'étude comparative d'une série d'acides α -aminés, relativement à leur action sur le d.glucose, permet de les classer, par ordre d'activité décroissante, d'après la liste suivante : *alanine* (d.), *valine* (d.), *glyocolle*, *acide glutamique* (d.), *leucine* (l.), *sarcosine*, *tyrosine* (l.). La sarcosine est très peu active, de par sa constitution même. En ce qui concerne la tyrosine, la leucine, l'acide glutamique, la réaction est manifestement retardée par leur solubilité difficile ou médiocre. La d.alanine est le plus actif des acides aminés, ce qui concorde tout à fait avec son rôle privilégié en chimie biologique.

Avec le glyocolle, le *xylose* et l'*arabinose* réagissent instantanément ; le *fructose*, le *galactose*, le *glucose*, le *mannose*, assez rapidement ; le *lactose* et le *maltose*, lentement ; le *saccharose* pas du tout pendant plusieurs heures, après quoi se produit une réaction lente, consécutive sans doute à un dédoublement.

L'allure du saccharose corrobore la *nécessité de la fonction aldéhydrique ou cétonique* pour la production des matières brunes et le dégagement de CO². Néanmoins le reste de la molécule peut influencer considérablement la vitesse des phénomènes, témoin le cas des pentoses, chez lesquels la réaction s'amorce et se poursuit avec une facilité extraordinaire.

La réaction générale peut même s'étendre aux *polypeptides*, dont la

chaîne moléculaire, comme celle des aminoacides simples, se termine par les fonctions NH^2 et COOH .

Un mélange de *glycyl-glycine* et de *xylose*, à 75° , brunit rapidement, dégage CO^2 comme à l'ordinaire, et fournit enfin des matières brunes insolubles dont les propriétés et l'allure vis-à-vis des réactifs sont les mêmes que celles des matières dérivant du glycocole. La réaction, plus lente, se produit également à 40° et à 34° .

Un mélange de *glycyl-glycine* et de *glucose*, à 75° , brunit rapidement, dégage CO^2 , et fournit plus tard des matières brunes insolubles dont les propriétés générales sont les mêmes que pour les autres matières du même groupe. La réaction se produit lentement à 40° , et même à 34° . La réaction est moins rapide avec le glucose qu'avec le xylose, conformément à ce qui se passe dans le cas des aminoacides simples.

Dans toutes ces réactions, le *dipeptide* glycyl-glycine se comporte donc comme le glycocole; cependant la formation des matières brunes est encore plus précoce, et le dégagement de CO^2 est plus tardif.

Les *peptones* du commerce, en présence du glucose ou du xylose à 110° , donnent assez rapidement les matières brunes et le dégagement de CO^2 . La vitesse de la réaction varie avec l'échantillon de peptone employé.

Les matières brunes solubles qui se produisent dans les premiers temps de la réaction rappellent le *caramel*, par l'odeur que l'on perçoit alors, par les propriétés physiques de ces matières, et par le phénomène de déshydratation intense auquel elles doivent naissance. Elles diffèrent du caramel par la présence de l'azote, en combinaison très solide. Si la déshydratation devait être considérée comme la caractéristique prédominante, et faire classer la formation du caramel et de mes substances brunes comme deux cas particuliers d'un même phénomène général, les acides aminés devraient alors être reconnus comme des *caramélisants très énergiques*.

Les matières brunes insolubles auxquelles aboutit finalement ma réaction ressemblent d'assez près, par leurs propriétés et même par leur composition centésimale (azote déduit) aux *matières non azotées*

dites « humiques » que l'on obtient par ébullition prolongée des sucres avec les acides minéraux. Ici encore, si la déshydratation autorisait à rapprocher étroitement ces produits non azotés des véritables matériaux naturels de l'humus, les acides aminés devraient être reconnus comme jouissant d'un *pouvoir humificateur remarquable*.

Les véritables *matières humiques* extraites des sols, terreaux, fumiers, tourbes, etc., et qui renferment toujours de l'azote en combinaison très solide, sont *identiques* aux produits bruns que j'ai obtenus par condensations des sucres avec les acides aminés. Rien ne permet de les en distinguer, ni dans les propriétés, ni dans la composition chimique générale, ni dans la teneur en azote, ni dans la solidité de liaison de cet élément.

En raison de l'extrême facilité de combinaison, même à basse température, des acides aminés (ou autres corps aminés provenant de la décomposition des protéiques) avec les sucres (provenant de la décomposition des polysaccharides), il est certain que la fixation de l'azote est la cause déterminante, et non la conséquence, de la déshydratation humificatrice. Loin d'être surajouté accessoirement et par hasard à une molécule humique qui se serait constituée en dehors de lui, *l'azote est au contraire le premier facteur de l'humification naturelle, qui sans lui n'aurait pas lieu*.

L'oxydation n'intervient en aucune façon dans la genèse des matières humiques. Les microorganismes peuvent intervenir dans une phase préparatoire consistant en la libération des sucres et des corps aminés à partir des polysaccharides et des protéiques; mais *ils ne prennent aucune part à l'humification* elle-même, c'est-à-dire à la formation des corps bruns.

La formation des *combustibles minéraux*, en ce qui concerne ses premiers stades, et indépendamment des phénomènes métamorphiques qui peuvent intervenir ultérieurement, n'est qu'un cas particulier de l'humification. Ici encore l'humification est sous la dépendance de l'azote, qui ne doit plus être considéré comme un élément accessoire des combustibles minéraux, mais tout au contraire comme l'élément *fossilisateur* auquel ils doivent leur naissance. On ne peut plus se contenter d'envisager dans la formation de la houille deux actes seulement, l'un fermentatif, l'autre métamorphique; il devient nécessaire d'admettre les trois actes suivants :

1^o Acte *biologique*, diastasique ou microbien, purement préparatoire :

décomposition des polysaccharides et des protéiques, libération des sucres et des corps aminés ;

2° Acte *chimique* purement automatique, aseptique : fixation de l'azote sur la fonction aldéhydique ou cétonique des sucres, phénomène intense de déshydratation et d'humification ;

3° Acte *métamorphique* : compression, échauffement, distillation, avec les modifications chimiques corrélatives : formation définitive des houilles et des anthracites.

Les *mélanoïdines* ou *acides mélanoïdiques* recueillis lors de l'hydrolyse acide des protéiques ou des tissus animaux ou végétaux, appartiennent à la même famille que les corps bruns obtenus par condensation des sucres avec les aminoacides. Ces mélanoïdines doivent résulter de la condensation d'acides aminés ou de polypeptides libérés par l'hydrolyse, avec des sucres provenant de la molécule protéique ou des matières étrangères, ou même avec des corps à fonction aldéhydique ou cétonique secondairement créée par l'action des agents d'hydrolyse.

La richesse en azote de ces mélanoïdines peut s'expliquer par la fixation, au lieu d'un acide aminé, d'une chaîne polypeptidique à plusieurs atomes d'azote.

Leur richesse en soufre peut s'expliquer par une aptitude particulière de la cystéine, en tant que dérivé de l'alanine, à des condensations de ce genre.

Les matières brunes que renferment divers produits des *industries alimentaires* (mélasses, pain d'épice, etc.) appartiennent évidemment au même groupe. On doit les observer chaque fois qu'on laisse en contact, à une concentration et à une température convenables, des sucres d'une part (ou des polysaccharides capables de les produire), et des corps aminés d'autre part (ou des protéiques susceptibles de leur donner naissance).

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Electro-osmose et thermo-osmose.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 27 janvier 1913.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Paris, le 27 janvier 1913.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.

